

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

AMANDA CAPISTRANO PINHEIRO

**Caminhos para a estabilização de betalaínas
e suas consequências**

Versão corrigida da Tese defendida

Data do Depósito na SPG: 29/06/2022

São Paulo

2022

Página deixada em branco intencionalmente.

AMANDA CAPISTRANO PINHEIRO

**Caminhos para a estabilização de betalaínas
e suas consequências**

Versão corrigida da Tese defendida

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

Área de Concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Erick Leite Bastos

São Paulo

2022

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

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

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

P654c Pinheiro, Amanda Capistrano
Caminhos para a estabilização de betalaínas e suas
consequências / Amanda Capistrano Pinheiro. - São
Paulo, 2022.
200 p.

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

Orientador: Bastos, Erick Leite

1. Fotofísica. 2. Físico-química orgânica. 3.
Betalaínas. I. T. II. Bastos, Erick Leite,
orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Caminhos para a estabilização de betalaínas e suas
consequências"

AMANDA CAPISTRANO PINHEIRO

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. Josef Wilhelm Baader
IQ - USP

Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
IQSC – USP (por videoconferência)

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch (por videoconferência)
UFRGS

SÃO PAULO
26 de julho de 2022

Página deixada em branco intencionalmente.

*Dedico essa tese aos meus pais, Maria e Onias,
e à minha irmã Paloma.*

Página deixada em branco intencionalmente.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Erick, por todos os ensinamentos no decorrer de tantos anos. Obrigada por toda a paciência, por ter me incentivado a ir além de onde acreditava poder ir e por contribuir para que eu trilhasse meu caminho no processo dessa tese. Como diz a música, é difícil agradecer a alguém que te levou do giz de cera ao perfume.

Aos amigos que fiz no laboratório, Aninha, Arthur, Barbara, Karina e Renan, obrigada pela amizade, pela companhia nas muitas horas no laboratório e fora dele, pelas discussões científicas e não científicas, sou grata por ter compartilhado parte desse caminho com vocês. Ao Felipe, pela amizade e pelo auxílio com o massas.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório em todos esses anos, em especial a Vivi, Larissa Gomes, Renan Rodini, Guilherme, Juan, Victor, Lucas e Katherine. Ao Arthur Falkembach, pelo auxílio com as medidas de difração circular. À Larissa e à Caroline, pela ajuda com o MTT e pela companhia nos meses pandêmicos. À Ihasmyn, por ser uma pessoa sempre muito gentil. Ao Cássio e ao Gustavo, pelas conversas de café.

À Ana Clara e à Leticia, por me acolherem e me acompanharem nos meus primeiros anos no laboratório, onde tudo era encantamento, e me ensinarem muito do que sei hoje.

Agradeço ao professor Jacinto Sá, por me receber com muito acolhimento, em um ano tão difícil, em seu laboratório em Uppsala e possibilitar todas as medidas de fotofísica resolvida no tempo. Aos seus alunos e colegas da *Hus 7*, Robert, Lars, Xin Jian, Vitor, João, Aiji e Nidhi, pela companhia e por me fazerem sentir parte do grupo. Agradeço especialmente ao Mohamed e ao Yo, por toda a ajuda com o laser e por serem pessoas muito gentis.

Aos técnicos do IQ: Janaína, Cristiane, Vânia, Giovana, César, Joca, Helena, Luciana e Alfredo pelas análises na central analítica e auxílio técnico em todo esse trabalho.

Aos funcionários do IQ-USP, por manterem o instituto funcionando. Aos funcionários da seção de pós-graduação, em especial ao Milton, pelo auxílio administrativo.

Aos professores do IQ, em especial ao Willi, Cassius, Omar e Frank, por todos os ensinamentos desde a graduação, e pelo uso de equipamentos e laboratórios. A professora Ana Maria e ao Rodrigo, pela grande ajuda com os experimentos no EPR.

Aos meus amigos do IQ, Marina, Lillian, Larissa e Paulo, companhia e apoio há mais tempo do que consigo contar; André, Glalci e Thaís, sempre na porta ao lado.

A todos os meus amigos, em especial ao Frei Flávio, Laís, Gabriel, Renan, Luana, Taylor, Mille e Amanda, por serem ponto de refúgio, pela companhia e compreensão em tantas

ausências.

Aos meus pais, Maria e Onias, por incentivarem os meus sonhos, por mais distantes que sejam, e por sempre terem feito tudo para me impulsionar em direção a eles. Os dois estão em todos os interstícios dessa tese. À minha querida irmã Paloma, por ser uma grande companhia e exemplo, por me acolher e me apoiar em todo os momentos.

À Deus, pelo universo ser caos e se auto-organizar.

À Fapesp (2015/18474-4; 2019/20449-9), CNPq (141255/2015-3) e Capes pelo apoio financeiro a essa tese e à pós-graduação. À USP, universidade pública, que permite que ciência seja construída com liberdade.

*"De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que ele estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escada, do sono uma ponte,
da procura um encontro".*

Fernando Sabino em *O Encontro Marcado*.

Página deixada em branco intencionalmente.

Resumo

PINHEIRO, A. C. **Caminhos para a estabilização de betalaínas e suas consequências**. 2022. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Betalaínas são pigmentos naturais antioxidantes encontrados em um número restrito de plantas e fungos. A característica estrutural mais marcante desses metabólitos é a presença de um sistema 1,7-diaza-heptametínio no qual um grupo imina ou imínio está conjugado a uma enamina. O uso de betalaínas como matéria prima para desenvolvimento de insumos químicos é parcialmente limitado pela sua sensibilidade à hidrólise. Nessa Tese de Doutorado foram propostas diferentes estratégias para a estabilização de betalaínas, cujas consequências incluem o desenvolvimento de produtos pseudo-naturais funcionais e materiais responsivos e quirais obtidos por automontagem. Para os estudos de estabilização intramolecular, foi criada a primeira betalaína-nitrona descrita, chamada de OxiBeet. Esta nova betalaína é muito mais estável em meio aquoso neutro ou alcalino do que seu análogo imínico, tem alta capacidade antioxidante *in vitro* e seu produto de oxidação de um elétron é um radical nítróxido persistente estabilizado por ressonância. Na tentativa de promover a estabilização por encapsulação, foram sintetizados complexos de inclusão betalaína@cucurbit[7]urila. A estabilização cinética promovida pelo macrociclo é acompanhada de um aumento do rendimento quântico de fluorescência da betalaína derivada da *p*-fenilenodiamina de até duas ordens de magnitude dependendo da viscosidade do meio e do pH. Estudos de espectroscopia ultrarrápida suportam a formação de um estado de transferência de carga pouco emissivo para esta betalaína quando a porção *para*-amino está desprotonada. Quando a síntese dessa betalaína é feita com a amina como reagente limitante, obtém-se um sólido azul. A análise por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de dicroísmo circular eletrônico revelaram se tratar de nanofios helicoidais quirais. Assim, foram exploradas novas abordagens para estabilização de betalaínas que resultaram em produtos pseudo-naturais com propriedades que não são encontradas nos produtos naturais dessa classe e que tem potencial para aplicação tecnológica.

Palavras-chave – betalaína, nitrona, cucurbiturila, agregado, quiralidade, produtos pseudo-naturais, química sustentável, química supramolecular.

Página deixada em branco intencionalmente.

Abstract

PINHEIRO, A. C. **Pathways to betalains stabilization and its consequences**. 2022. 200 p. Thesis (Doctorate) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Betalains are antioxidant natural pigments found in a restricted number of plants and fungi. The most striking structural feature of these metabolites is the presence of a 1,7-diazahexamethinium system in which an imine or iminium group is conjugated to an enamine. The use of betalains as a raw material for the development of chemical inputs is partially limited by their sensitivity to hydrolysis. In this Doctoral Thesis, different strategies were proposed for the stabilization of betalains, whose consequences include the development of functional pseudo-natural products and responsive chiral materials obtained by self-assembly. During the studies of intramolecular stabilization, OxiBeet, the first betalain-nitrone, was created. This new betalain is more stable in neutral or alkaline aqueous media than its imine analogue, has a high *in vitro* antioxidant capacity and its one electron oxidation product is a persistent nitroxide radical stabilized by resonance. In an attempt to promote stabilization by encapsulation, betalain@cucurbit[7]uril inclusion complexes were synthesized. The kinetic stabilization promoted by the macrocycle is accompanied by an increase in the fluorescence quantum yield of betalain derived from *p*-phenylenediamine of up to two orders of magnitude depending on the viscosity of the medium and pH. Ultrafast spectroscopy studies support the formation of a low-emissive charge transfer state for this betalain when the *para*-amino moiety is deprotonated. When the synthesis of this betalain is carried out using the amine as a limiting reagent, a blue solid is obtained. Analysis by transmission electron microscopy and electronic circular dichroism spectroscopy revealed the formation of chiral helical nanowires. Thus, new approaches for stabilizing betalains were explored and resulted in pseudo-natural products with properties that are not found in natural products of this class and that have potential for technological application.

Keywords – betalain, nitrone, cucurbituril, aggregate, chirality, pseudo-natural products, sustainable chemistry, supramolecular chemistry.

Página deixada em branco intencionalmente.

Lista de abreviaturas e siglas

COSY	Espectroscopia de correlação, <i>do inglês correlation spectroscopy</i>
DAS	Espectro de decaimento associado
EAS	Espectro de evolução associada
EDG	Grupo doador de elétrons, <i>do inglês electron donating group</i>
EIS	Efeito isotópico do solvente
EICS	Efeito isotópico cinético do solvente
EIES	Efeito isotópico de equilíbrio do solvente
EPR	Ressonância paramagnética de elétron
ESA	Absorção do estado excitado, <i>do inglês excited state absorption</i>
EWG	Grupo atraente de elétrons, <i>do inglês electron withdrawing group</i>
EXSY	Espectroscopia de troca, <i>do inglês exchange spectroscopy</i>
GSB	Branqueamento/depleção do estado fundamental, <i>do inglês ground state bleaching</i>
Hbt ^a	Ácido betalâmico
hfcc	Constante de acoplamento hiperfino
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações, <i>do inglês heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, <i>do inglês high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrômetro de massas de alta resolução, <i>do inglês high resolution mass spectrometer,</i>
HSQC	Coerência de quântica única heteronuclear, <i>do inglês heteronuclear single quantum correlation</i>
IRF	Função de resposta instrumental, <i>do inglês instrument response function</i>
k_{nr}	Constante cinética para processos não radiativos
k_{obs}	Constante cinética observada
k_r	Constante cinética para processos radiativos
J	Constante de acoplamento
m/z	Relação entre massa e carga
NOESY	Espectroscopia de efeito Overhauser nuclear, <i>Nuclear Overhauser</i>

effect spectroscopy

RMN	Ressonância magnética nuclear
SE	Emissão estimulada, <i>do inglês stimulated emission</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
t_R	Tempo de retenção

^a Essa é a única abreviação de nome de reagente listada aqui, dada a sua importância. Para as abreviações usadas para outros reagentes vide a Tabela 1, p. 31.

Lista de símbolos

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

Página deixada em branco intencionalmente.

Sumário

PREÂMBULO	25
PROPRIEDADES E POTENCIAL APLICADO DE BETALAÍNAS	27
BETALAÍNAS SÃO COMPOSTOS LÁBEIS	28
ESTABILIZAÇÃO DE BETALAÍNAS	29
PARTE EXPERIMENTAL GERAL	31
<i>Reagentes e solventes</i>	<i>31</i>
<i>Soluções</i>	<i>33</i>
<i>Métodos cromatográficos</i>	<i>34</i>
<i>Métodos espectroscópicos e espectrométricos</i>	<i>34</i>
1. CAPÍTULO 1 – BETALAÍNA NITRONA: ESTABILIZAÇÃO INTRAMOLECULAR	37
1-1. INTRODUÇÃO	37
1-1.1. <i>Nitronas e estabilidade</i>	<i>37</i>
1-1.2. <i>Nitronas e radicais</i>	<i>38</i>
1-2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1-2.1. <i>Betalaína-nitrona: semissíntese e caracterização estrutural</i>	<i>39</i>
1-2.2. <i>Propriedades de absorção UV-Vis e fluorescência da OxiBeet</i>	<i>41</i>
1-2.3. <i>Estabilidade da OxiBeet frente à hidrólise</i>	<i>47</i>
1-2.4. <i>Capacidade antirradicalar e oxidação</i>	<i>57</i>
1-2.5. <i>Formação de radical estabilizado</i>	<i>59</i>
1-3. CONCLUSÕES	61
1-4. PARTE EXPERIMENTAL	62
1-4.1. <i>Soluções</i>	<i>62</i>
1-4.2. <i>Semissíntese de pBeet</i>	<i>62</i>
1-4.3. <i>Semissíntese de OxiBeet</i>	<i>63</i>
1-4.4. <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i>	<i>63</i>
1-4.5. <i>Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica</i>	<i>64</i>
1-4.6. <i>Determinação do coeficiente de absorção molar</i>	<i>64</i>
1-4.7. <i>Determinação de valores de pK_a</i>	<i>65</i>
1-4.8. <i>Cinética da decomposição</i>	<i>65</i>
1-4.9. <i>Voltametria cíclica</i>	<i>65</i>
1-4.10. <i>Determinação da capacidade antirradicalar</i>	<i>66</i>

2. CAPÍTULO 2 – COMPLEXOS BETALAÍNA-CB[7]: ESTABILIZAÇÃO INTERMOLECULAR ..	67
2-1. INTRODUÇÃO.....	67
2-1.1. <i>Cucurbiturilas como hospedeiros</i>	67
2-2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2-2.1. <i>Complexação entre betaxantinas e CB7</i>	71
2-2.2. <i>Estabilidade hidrolítica de Bx@CB7</i>	89
2-2.3. <i>Propriedades dos estados excitados de betaxantinas complexadas</i>	97
2-3. CONCLUSÕES.....	126
2-4. PARTE EXPERIMENTAL	127
2-4.1. <i>Soluções</i>	127
2-4.2. <i>Semissíntese de p-NH₂-pBeet</i>	128
2-4.3. <i>Titulação da cucurbit[7]urila</i>	128
2-4.4. <i>HPLC-MS</i>	129
2-4.5. <i>Isoterma de complexação</i>	129
2-4.6. <i>Determinação de valores de pK_a</i>	129
2-4.7. <i>Determinação do rendimento quântico de fluorescência</i>	130
2-4.8. <i>Cinética da decomposição</i>	131
2-4.9. <i>Tempo de vida de fluorescência</i>	131
3. CAPÍTULO 3 – NANOFIOS QUIRAIS BETALAÍNICOS	133
3-1. INTRODUÇÃO.....	133
3-2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
3-2.1. <i>Semissíntese e caracterização estrutural</i>	135
3-2.2. <i>Constantes de dissociação ácida</i>	139
3-2.3. <i>Coefficiente de absorção molar e hidrólise de WireBeet</i>	141
3-2.4. <i>Absorção transiente</i>	144
3-2.5. <i>Automontagem em agregados helicoidais</i>	148
3-3. CONCLUSÕES.....	154
3-4. PARTE EXPERIMENTAL	155
3-4.1. <i>Semissíntese de WireBeet</i>	155
3-4.2. <i>HPLC-MS</i>	155
3-4.3. <i>Determinação do coeficiente de absorção molar</i>	155
3-4.4. <i>Determinação de valores de pK_a</i>	156
3-4.5. <i>Cinética de formação de WireBeet em meio aquoso</i>	156
3-4.6. <i>Dicroísmo circular</i>	157
3-4.7. <i>Microscopia de eletrônica de transmissão</i>	157

CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS.....	161
SÚMULA CURRICULAR	173
ANEXOS	177

Página deixada em branco intencionalmente

Preâmbulo

Matérias primas de fontes renováveis podem substituir substâncias químicas derivadas do petróleo permitindo o desenvolvimento de insumos químicos para aplicação de forma mais sustentável e com menos impacto negativo à saúde humana e meio ambiente.^[1-3] O uso de produtos naturais (*metabólitos secundários*), entretanto, encontra desafios relacionados à escala de obtenção e sazonalidade das espécies de interesse. Produtos pseudo-naturais são substâncias baseadas em arcabouços estruturais vindos de metabólitos secundários.^[4-6] Esses compostos podem ser obtidos por síntese total ou por síntese parcial, também chamada de semissíntese, que se baseia no uso de blocos de construção de origem natural. O ponto chave para o desenvolvimento de produtos pseudo-naturais para estudos de ciência básica e/ou inovação tecnológica é a escolha do metabólito de partida.

Betalaínas são pigmentos naturais nitrogenados encontrados em plantas da ordem Caryophyllales, em fungos basidiomicetos e na bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Figura 1).^[7] As funções desses metabólitos secundários se relacionam à pigmentação para sinalização visual e proteção antioxidante. *Betacianinas* são betalaínas da cor magenta ($\lambda_{Abs}^{máx} \sim 540$ nm) derivadas da ciclo-DOPA que são encontradas na forma da aglicona ou glicosiladas. As demais betalaínas naturais tem cor amarelo-laranja ($\lambda_{Abs}^{máx} \sim 480$ nm) e são classificadas como *betaxantinas*. As espécies mais conhecidas pigmentadas por betalaínas, como a beterraba (*Beta vulgaris* L.; >200 mg de betanina/100 g de beterraba)^[8,9], a opuntia [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]^[10], a primavera (*Bougainvillea* sp.), o amaranto (*Amaranthus* spp.) e a pitaia (*Hylocereus* spp.)^[11] são encontradas em tons de laranja, magenta e vermelho.

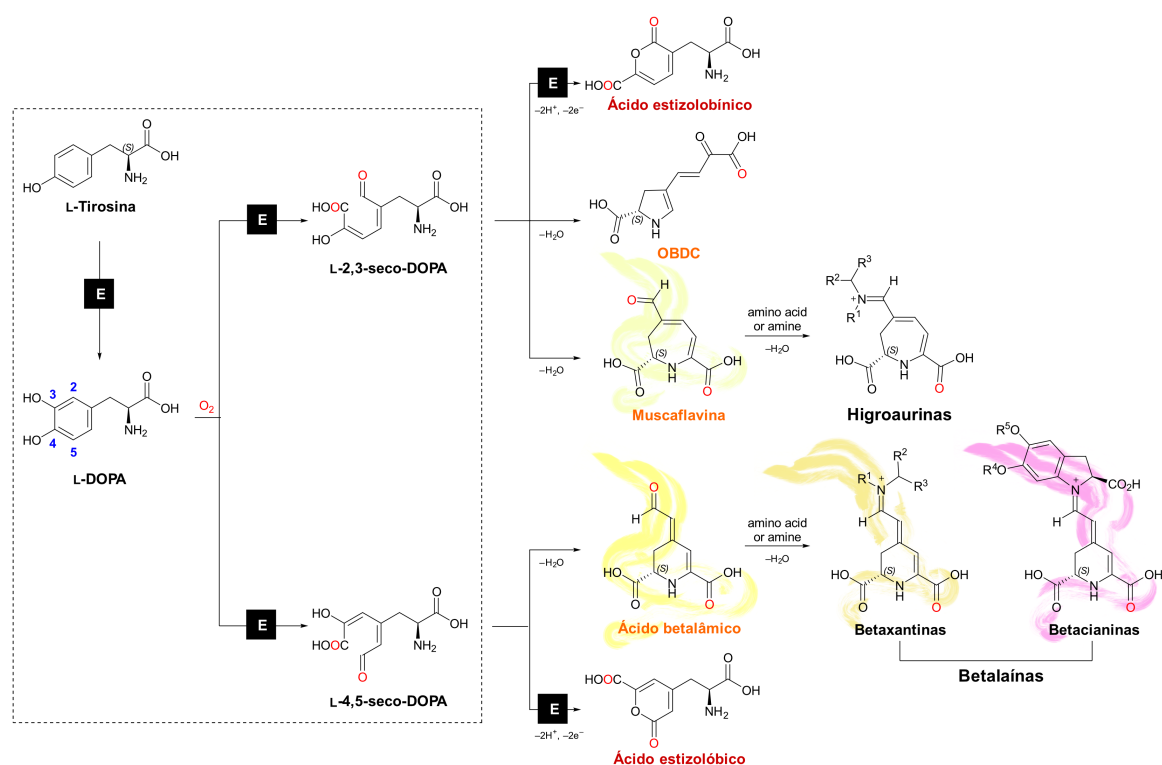
Um dos fenômenos naturais mais intrigantes relacionado à sinalização de plantas é a fluorescência das pétalas de flores pigmentadas por betaxantinas.^[12,13] As pétalas das variedades amarelas da onze-horas (*Portulaca grandiflora* Hook.)^[14] e da maravilha (*Mirabilis jalapa* L.) emitem luz verde quando irradiadas com luz azul.^[12] O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{Fl} , relação entre o número de fótons absorvido e emitido) das betaxantinas é inferior a 0,01 e, por isso, a função biológica dessa fluorescência tem sido questionada.^[15]



Figura 1. Algumas fontes de betalínas. (A) Fungo agário das moscas, (B) beterrabas vermelhas e amarelas, (C) onze horas, (D) amaranto, (E) ficóide e (F) pitaia vermelha.

Além da fluorescência das flores, há dois fatos biológicos intrigantes relacionados às betalínas.^[16] Betalínas e antocianinas são pigmentos mutuamente exclusivos na natureza, ou seja, nunca foram encontradas no mesmo ser vivo e algumas espécies de fungos basidiomicetos, como o agário das moscas (*Amanita muscaria*), produzem betalínas por possuírem uma DOPA extradiol dioxigenase que, embora seja estruturalmente diferente da enzima encontrada em plantas, cumpre a mesma função.^[17] Betalínas são caracterizadas pelo sistema 1,7-diazaheptametínio, um cromóforo que se origina da condensação entre o grupo aldeído do ácido betalâmico e nucleófilos de nitrogênio.^[18] Esse sistema conjugado associa uma imina e uma enamina e é responsável pela cor, emissão de fluorescência,^[13] propriedades redox e pelo potencial antioxidante^[19,20] das betalínas. A biossíntese das betalínas e seus isômeros, assim como suas estruturas, são apresentadas no Esquema 1.

Além da dificuldade de obtenção de betalínas, que estão presentes em quantidades mínimas em plantas, a presença de vários grupos ionizáveis torna o estudo desses compostos desafiador. Todas as betalínas possuem uma porção 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetra-hidropiridínio quiral e há poucos relatos sobre os equilíbrios de dissociação ácida de betalínas.^[21] Os pK_a s dos dois ácidos carboxílicos da betanina foram determinados como 3,4 e o pK_a da hidroxila na posição 6 da porção ciclo-DOPA é 8,5.^[21] Propõe-se que o pK_a do ácido carboxílico ligado à ciclo-DOPA seja menor do que 3,4, pois o ponto isoelétrico da betanina está entre 1,5 e 2,0,^[21] o que está de acordo com estimativas feitas usando o método aditivo implementado no programa Marvin Sketch: pK_a CO_2H , ciclo-DOPA, 1,5, pK_a $C\ sp^2-CO_2H$, 3,0 e pK_a $C\ sp^3-CO_2H$, 3,7.^[22] De fato, estudos computacionais vem sendo realizados para determinar os pK_a s de betalínas,^[23,24] porque a presença de grupos muito ácidos e de constantes de dissociação muito próximas para dois ou mais grupos dificulta a medida experimental.



Esquema 1. Biossíntese de betalainas, higroaurinas e compostos relacionados. A formação das duas classes de betalainas, a saber, betacianinas e betaxantinas, tanto *in vivo* como *in vitro*, resulta do acoplamento espontâneo do ácido betalâmico com derivados de ciclo-DOPA e amins/aminoácidos, respectivamente. A reação análoga de amins ou aminoácidos com muscaflavina produz higroaurinas. A ciclização desidratante da L-4,5-seco-DOPA é espontânea sob condições aquosas ácidas. Nomes escritos nas mesmas cores indicam isômeros. “E” designa transformações enzimáticas. Os grupos amino e carboxila são apresentados nas formas não carregadas para maior clareza. Esquema adaptado de [17].

Propriedades e potencial aplicado de betalainas

A aplicação primária de betalainas é seu uso como corantes para alimentos e cosméticos. Extrato de beterraba rico em betanina é aprovado por agências reguladoras (EFSA/E162 e FDA/73.40) para consumo humano.^[25] No final do século XX, descobriu-se que betalainas possuem capacidade antioxidante maior do que aquela da maioria dos flavonóides, do ácido ascórbico, da vitamina E e de seu análogo hidrossolúvel Trolox.^[25] A atividade antirradicalar de betalainas costuma ser determinada por ensaios com o cátion radical ABTS^{•+} e reportada em termos de capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox (TEAC).^[26] A oxidação de betalainas em 1 e⁻ envolve a ocorrência de transferência de elétron acoplada a próton (PCET)^[19,24,25,27,28] e o sistema 1,7-diaza-heptametínio estabiliza por ressonância os radicais

formados. A descarboxilação e a aromatização, formando descarboxibetanina e neobetanina, são as principais vias de oxidação da betanina por ABTS^{•+} e por cátions metálicos como o Cu(II).^[25,29] Esse potencial antioxidante se correlaciona com a atividade farmacológica de betalaínas, em especial betaxantinas, que incluem atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e prevenção de processos deletérios relacionado ao estresse oxidativo.^[30–32]

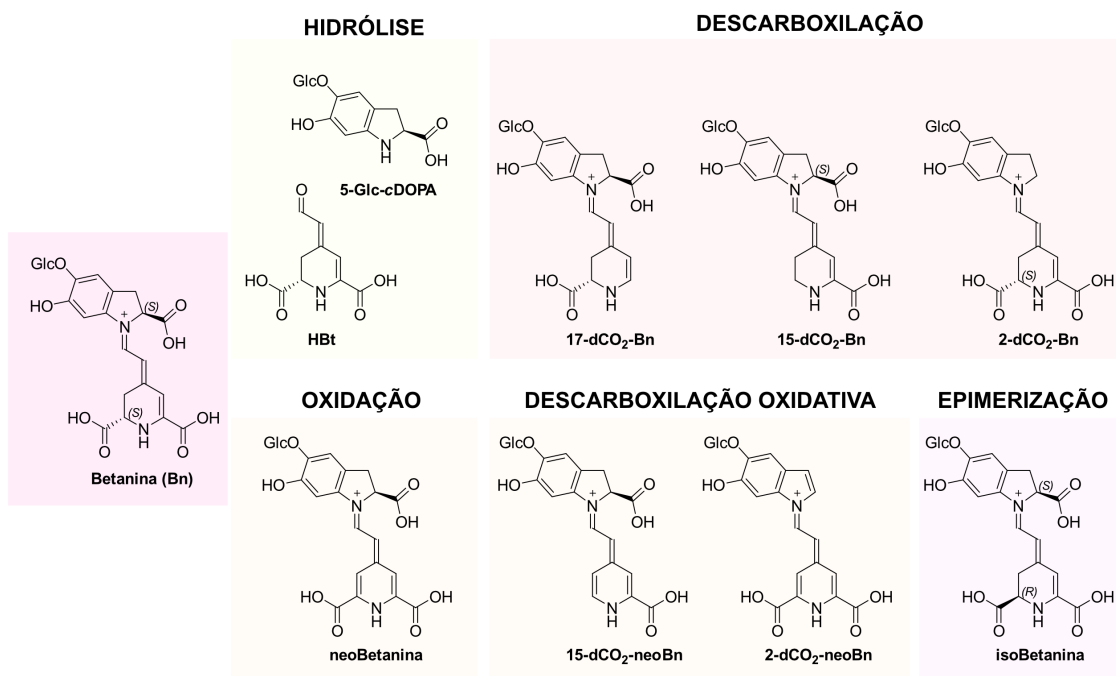
Dadas as suas propriedades redutoras e complexação com cátions em meio aquoso neutro, betalaínas são usadas na síntese de nanopartículas metálicas.^[33–37] Desta forma, foram preparados nanocatalisadores plasmônicos para fotossíntese artificial^[38] e nanocatalisadores reutilizáveis e recuperáveis suportados em esferas de polímero,^[35] Além disso, betalaínas são usadas em células solares sensibilizadas por corante (DSSC) porque a injeção de elétrons pode ser facilitada pelo ancoramento dos ácidos carboxílicos da betalaína na superfície do TiO₂.^[39,40]

Betaxantinas são mais fluorescentes do que betacianinas^[26] e a reação entre ácido betalâmico e aminas fluorescentes permite formar betalaínas pseudo-naturais mais fluorescentes do que as naturais e com novas propriedades. A reação entre ácido betalâmico e 7-amino-4-metilcumarina (C120) resulta na betalaína cBeet120, mais fluorescente do que a maioria das betalaínas ($\phi_{FI} = 4,3 \times 10^{-3}$) e utilizada como sonda fluorescente para detectar por microscopia eritrócitos infectados com *Plasmodium* spp., o agente causador da malária.^[41] Adicionalmente, cBeet120 e cBeet151, derivada da cumarina 151, possuem apreciável seção de choque de absorção de 2 fótons em água, com brilho comparável à sondas como fluoresceína e cumarina 153 e cuja emissão de fluorescência pode ser modulada pelo aumento do confinamento através da mudança do ambiente no entorno, como, por exemplo, na presença de micelas reversas de AOT.^[42]

Betalaínas são compostos lábeis

Betalaínas são sensíveis à ácidos e bases fortes, luz intensa, alta temperatura, alta concentração de oxigênio e de cátions metálicos.^[43] Devido à alta eletrofilicidade do carbono da ligação imina, betalaínas sofrem hidrólise, na qual há quebra da ligação aldimínica para a formação do ácido betalâmico e da amina precursora.^[22,43] A curva obtida quando se correlaciona a constante cinética observada (k_{obs}) da decomposição de betanina com o pH tem um formato de sino invertido, característico da ocorrência de catálise ácida geral, como observado na hidrólise da aspirina.^[22,44] A estabilidade de betalaínas em solução é dependente do pH, sendo que a estabilidade é máxima para a maioria dos derivados na faixa de pH entre 4 e 7, em semelhança à iminas.^[22,45,46]

O aquecimento de betanina a temperaturas relativamente altas (e.g., 80 °C) resulta principalmente na degradação por hidrólise, tendo ácido betalâmico e ácido betalâmico descarboxilado e oxidado como produtos.^[22,47] O aquecimento prolongado de betanina também leva ao surgimento de betanina descarboxilada, neobetanina descarboxilada (produto da descarboxilação oxidativa) e epimerização.^[47,48] Betanina hidrolisada pode ser regenerada em meio ácido ou por resfriamento,^[46] mas a presença de oxigênio e o aquecimento aumentam a sua velocidade de degradação, diminuindo a sua capacidade de regenerar-se dada a ocorrência de descarboxilação irreversível. O Esquema 2 apresenta as estruturas dos principais produtos de decomposição de betanina.^[49]



Esquema 2. Principais produtos de decomposição da betanina. Adaptado da ref. ^[50].

Estabilização de betalaínas

Estratégias para a estabilização de betalaínas devem envolver a redução da atividade de água do meio e a sua autooxidação.^[46,51] Antioxidantes como o ácido ascórbico, ácido isoascórbico e ácido cítrico podem estabilizar betalaínas até certa extensão, prevenindo a sua oxidação.^[52,53] A inclusão de betalaínas presentes no suco de beterraba em β -ciclodextrina aumenta a sua estabilidade na ausência de luz e oxigênio.^[52,54] Secagem por aspersão (*spray-drying*) usando maltodextrina aumenta a estabilidade de betalaínas, preservando a sua capacidade antioxidante e ampliando o tempo de prateleira de produtos que as contém.^[55-57]

Mudanças estruturais podem contribuir com o aumento da estabilidade de betalaínas. Betalaínas naturais contendo esqueletos de ácidos hidroxicinâmicos são mais estáveis devido ao empilhamento intramolecular.^[58,59] Betalaínas *N*-metiladas são mais estáveis em comparação com seus análogos imínicos.^[19] A reação entre ácido betalâmico e 2,4-dimetilpirrol resulta na BeetBlue, uma *quasibetalaína* azul, que contém um sistema 1,11-diaza-undecametínio e é mais estável em água do que betalaínas naturais.^[60]

A Tese desenvolvida aqui é que betalaínas podem ser estabilizadas frente à hidrólise através da conversão da sua porção imina em nitrona ou via encapsulamento com cucurbit[7]urila (CB7). Os achados mais importantes durante os testes de hipóteses são os seguintes: *i*) fenil-betaxantina (pBeet) hidrolisa mais rapidamente em meio aquoso neutro ou alcalino do que sua nitrona análoga (OxiBeet), *ii*) a oxidação da OxiBeet em um elétron leva a um radical persistente estabilizado por ressonância pelo sistema 1,7-diaza-heptametínio e com sinal de EPR distinto, *iii*) o encapsulamento de pBeet e *para*-aminopBeet (*p*-NH₂-pBeet) em cucurbit[7]urila aumenta a sua estabilidade e emissão de fluorescência e *iv*) a semissíntese de uma bis-betaxantina (WireBeet) leva a formação de um agregado helicoidal azul em meio ácido. O texto é estruturado em três capítulos apresentados após este preâmbulo. Os materiais e os métodos gerais são apresentados a seguir e os detalhes específicos são apresentados em cada capítulo. Ao término da tese são apresentadas conclusões finais que integram os capítulos.

Parte experimental geral

Reagentes e solventes

Geral

Os reagentes e solventes comerciais (Tabela 1) foram utilizados sem purificação prévia, exceto quando indicado.

Tabela 1. Nomes, abreviaturas e outros detalhes dos principais reagentes comerciais citados nesta Tese.

Reagente	Fórmula/ Abreviatura	Fornecedor	Conc.
2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) de amônio	ABTS	S-A ^a	
Ácido acético	CH ₃ COOH	S-A	
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	S-A	
Ácido clorídrico	HCl	Synth	37%
Ácido clorídrico deuterado	DCl	S-A	35%
Ácido fórmico	HCOOH	S-A	
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	S-A	87%
Ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	<i>p</i> -TsOH	S-A	
Anilina ^b		S-A	
Boro-hidreto de sódio	NaBH ₄	S-A	
Cloreto de potássio	KCl	S-A	
Di-hidrogenofosfato de sódio	NaH ₂ PO ₄	S-A	
Hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto(II)	Cobaltoceno	S-A	
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	S-A	
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Synth	28-30%
Hidróxido de sódio	NaOH	S-A	
Hidróxido de sódio deuterado	NaOD	S-A	40%
<i>N</i> -Fenil-hidroxilamina		S-A	
Nitrato de prata	AgNO ₃	S-A	

Tabela 1. (cont.)

Reagente	Fórmula/ Abreviatura	Fornecedor	Conc.
<i>p</i> -Azodianilina	<i>p</i> -ada	S-A	
Persulfato de potássio	K ₂ O ₈ S ₂	S-A	
<i>p</i> -Fenilenodiamina		S-A	
Trolox		S-A	
Sephadex LH-20		G.E.	
Acetato de etila	AcOEt	Synth	
Acetonitrila grau HPLC		Merck	
Água deuterada	D ₂ O	S-A	
Etanol	EtOH	Synth	
Etilenoglicol	EG	S-A	
Glicerol	Gli	S-A	
Isopropanol	i-PrOH	Merck	
Metanol grau HPLC	MeOH	Merck	

^a S-A: Sigma-Aldrich.

^b Destilada sob pressão reduzida antes do uso.

Suco de beterraba

Beterrabas frescas (1 kg) foram processadas em uma centrífuga de alimentos (Philips-Walita, modelo RI1855) e o suco obtido (500 mL) foi filtrado em filtro de pano, centrifugado (10 min, 5 °C, 7500 ×g) e filtrado a vácuo por sílica gel (2 cm, 20 mmHg).

Betanina (Bn)

O pH do suco de beterraba foi ajustado a 2 com HCl 37%, isopropanol foi adicionado (5 mL para cada 10 mL de suco) e a solução resultante foi congelada a -72 °C (gelo seco/etanol) por 20 min e mantida a -20 °C por 96 h. Após esse período, o material foi descongelado a 25 °C, a suspensão resultante foi centrifugada (5 min, 5 °C, 5000 ×g) e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de etanol, centrifugado (5 min, 5 °C, 5000 ×g) e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi solubilizado em água, centrifugado (5 min, 5 °C, 5000 ×g) e o sobrenadante foi liofilizado. A betanina resultante foi armazenada a -20 °C.

Ácido betalâmico (Hbt)

Suco da beterraba (500 mL) foi refrigerado a 10 °C e o pH do meio foi levado a 11,4 com a adição de NH₄OH 30%. A solução foi mantida sob agitação mecânica, mantendo-se a temperatura abaixo de 10 °C, até atingir a coloração esverdeada com fundo amarelo brilhante característico do ácido betalâmico. Então, a solução foi resfriada em banho de gelo e o pH foi levado a 1,5 com a adição de HCl 37%, evitando-se que a temperatura subisse acima de 5 °C. A suspensão ácida resultante foi transferida para um funil de separação e adicionaram-se 150 mL de acetato de etila (30% do volume inicial do suco). A emulsão foi centrifugada (5000 ×g, 2 min, 5 °C) e a fase orgânica amarela contendo ácido betalâmico foi separada. A solução foi congelada a -72 °C para precipitação de NH₄Cl dissolvido e filtrada a vácuo rapidamente em um funil de Büchner. A solução de ácido betalâmico em acetato de etila foi armazenada a -20 °C e ao abrigo da luz.

Soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água desmineralizada (18 MΩ·cm, milli-Q, Millipore), que será tratada em toda a Tese como “água”.

Soluções aquosas

NaOH, 1 mol L⁻¹: 4,0 g de NaOH foram adicionados a um balão volumétrico e o volume foi completado para 100 mL com água.

NaOH, 0,2 mol L⁻¹: 0,8 g de NaOH foram adicionados a um balão volumétrico e o volume foi completado para 100 mL com água.

HCl, 1 mol L⁻¹: 8,2 mL de HCl 37% ($d = 1,2 \text{ g mL}^{-1}$) foram adicionados a um balão volumétrico contendo água e o volume foi completado até 100 mL com água.

HCl, 1 mmol L⁻¹: 100 µL de uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ foram adicionados a um balão volumétrico contendo água e o volume foi completado até 100 mL com água.

Soluções tampão

Britton-Robinson (40 mmol L⁻¹, pH 2-12): em um balão volumétrico, 0,618 g de ácido bórico (40 mmol L⁻¹), 572 µL de ácido acético (40 mmol L⁻¹) e 496 µL de ácido fosfórico (40 mmol L⁻¹) foram dissolvidos em água deionizada e o volume foi levado a 250 mL. O pH das soluções tampão foi ajustado de 1,7 para de 2 a 12 utilizando-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹ e as soluções resultantes foram mantidas a 4 °C até o uso.

Fases móveis

Solvente A (0,05% (v/v) HCO₂H/H₂O): 250 µL de ácido fórmico foram adicionados a 500 mL de água.

Solvente B (0,05% (v/v) HCO₂H/MeCN): 250 µL de ácido fórmico foi adicionado a 500 mL de acetonitrila grau HPLC.

Métodos cromatográficos

Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-PDA)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado com uma coluna Ascentis C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm, Supelco) a 30 °C e com um detector de arranjo de diodos (PDA) SPD-M20A. A separação dos compostos foi realizada com um gradiente 5- 95% B em 30 min com fluxo 1,0 mL min⁻¹.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

As análises de HPLC-MS baixa resolução foram realizadas em um equipamento Amazon Speed ETD Bruker com ionização por *eletrrospray* em modo positivo e armadilha de íons. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Supelco Ascentis C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária. A eluição foi realizada com um gradiente de 5 a 95% de B em 42 min com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

As análises de HPLC-MS alta resolução foram realizadas em um equipamento MAXIS 3G da Bruker Daltonics com ionização por *electrospray* em modo positivo e detecção q-TOF. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Supelco Ascentis C18 – 250 x 4.6 mm – 5 µm, como fase estacionária e a eluição foi realizada com um gradiente de 2% de B por 5 min e de 2 a 95% de B em 30 minutos com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

Métodos espectroscópicos e espectrométricos

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ¹H foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 500 MHz com sonda TXI de 5 mm. O programa de pulso *zgpr* (pré-saturação) foi utilizado para suprimir o sinal da água. As amostras foram preparadas em D₂O imediatamente antes da aquisição dos espectros a uma concentração de 0,3 mg mL⁻¹. Os deslocamentos químicos foram reportados como δ (ppm) utilizando-se propionato de trimetilsilil (TSP) como padrão interno.

Espectros de absorção UV-Vis, emissão e excitação

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos em cubeta de quartzo ou PMMA (polimetilmetacrilato) com caminho óptico de 10 mm em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio equipado com um porta celas termostatizável com 18 posições; faixa de comprimento de onda: 300-750 nm, velocidade de varredura: 4800 nm min⁻¹. Os espectros de fluorescência (emissão, EM, e excitação, EX) foram adquiridos em cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm um espectrofluorímetro Varian Eclipse em um porta celas termostatizável. Todos os espectros foram adquiridos a 25 °C ± 1 °C; velocidade de varredura: 600 nm min⁻¹, fendas de EX e EM: 20 nm; voltagem da multiplicadora: 600 V.

Absorção transiente ultrarrápida

Medidas de absorção transiente ultrarrápida foram realizadas utilizando-se um sistema constituído por um laser Ti:Safira (Libra Ultrafast Amplifier System projetado por Coherent, 795 nm, FWHM ≈ 40 fs, 1 mJ/pulso e velocidade de repetição de 3 kHz) e um espectrógrafo de imagem Newport MS260i. O pulso de saída do amplificador regenerativo de 795 nm foi dividido em duas partes. A parte transmitida foi direcionada em um amplificador paramétrico óptico (TOPAS prime, Light Conversion) para gerar um feixe de excitação (*pump*) com diâmetro aproximado de 300 μm que foi focalizado na amostra. O feixe refletido foi submetido a atraso (8,5 ns; *step size* = 1-2 fs), foi focalizado em um cristal de safira ou fluoreto de cálcio e o feixe de luz branca contínua resultante foi usado para monitoramento (*probe*). Os pulsos *pump* foram divididos por um *chopper* operando a 1,5 kHz e a mudança de absorbância foi calculada com dois pulsos *probe* adjacentes (*pump*-bloqueado e *pump*-desbloqueado). As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm e as medidas foram realizadas em temperatura ambiente. Na Tabela 2 são apresentados os comprimentos de onda do feixe *pump* e os cristais utilizados para gerar o feixe *probe* para as diferentes amostras estudadas.

Tabela 2. Configurações utilizadas nas medidas de espectroscopia de absorção transiente

Amostra	λ^{EX}	Potência (desvio)	Cristal (<i>probe</i>)
OxiBeet	485 nm	1,0 mW ± 2%	Safira
pBeet	520 nm	0,5 mW ± 2%	CaF ₂
<i>p</i> -NH ₂ -pBeet	520 nm	0,5 mW ± 2%	CaF ₂
WireBeet	575 nm	1,0 mW ± 2%	Safira

Página deixada em branco intencionalmente.

Capítulo 1

Betalaína nitrona: estabilização intramolecular

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 Rad Biol Med, 168: 110 (2021).

1-1. Introdução

O principal produto de decomposição de betanina é o ácido betalâmico, resultado da hidrólise na porção imínica que o une à ciclo-DOPA 5-*O*-glicosilada.^[22,61] Há três caminhos principais para evitar a hidrólise de betalaínas: diminuição da atividade da água, aumento da lipofilicidade no centro de reação e diminuição da eletrofilicidade do carbono carbonílico da imina. Em trabalhos anteriores do grupo, a reação de ácido betalâmico com anilinas secundárias substituídas com grupos metila^[19] ou fenila^[62] aumentou a estabilidade das betalaínas frente à hidrólise. Esse resultado está relacionado a uma combinação entre aumento da lipofilicidade e da energia do LUMO destas betalaínas quando comparadas a betaxantinas naturais.

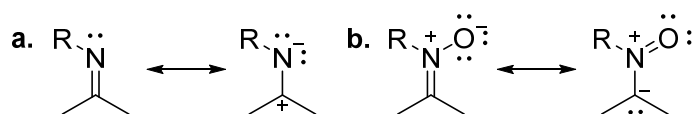
A pergunta que o primeiro capítulo dessa Tese procura responder é se uma betalaína-nitrona é mais estável frente à hidrólise do que betalaínas naturais. A hipótese testada considerou que a presença de uma hidroxila ligada diretamente ao N7 do sistema 1,7-diaza-heptametínio aumentaria a energia do LUMO desta betalaína o que seria acompanhado pela redução da eletrofilicidade do carbono imínico e aumento da persistência em água.^[63]

1-1.1. Nitronas e estabilidade

A reação de aldeídos e cetonas com aminas ou nucleófilos de nitrogênio relacionados é o método mais comum para produzir iminas, sais de imínio e enaminas. Nessas reações, a

presença de água no meio compromete o rendimento, visto que o equilíbrio é deslocado no sentido dos reagentes como consequência do processo de hidrólise dos produtos.^[64,65] Este equilíbrio encontra aplicações no desenvolvimento de pró-fármacos, bibliotecas dinâmicas combinatórias e sistemas supramoleculares automontáveis.^[66-70]

Quando iminas ($R_2C=NR$ com $R = H$, hidrocarbilo) são comparadas com oximas ($R_2C=NOH$)^[71] e nitronas ($R_2C=N^+(O^-)R'$ com $R' \neq H$ ou $R_2C=N^+(OH)R'$),^[72] a presença do grupo O^- (*N*-óxido) ou OH aumenta a densidade de carga negativa no carbono carbonílico (Esquema 3), aumentando a estabilidade hidrolítica ao mesmo tempo que mantém a reversibilidade necessária para as possíveis aplicações.^[73] Esse efeito está relacionado à deslocalização do par de elétrons não-ligantes do átomo de oxigênio, aumentando a energia do LUMO destes compostos em comparação com as iminas correspondentes.^[74] Nos dois casos, há uma ligação NO que, apesar de mais fraca do que NC ($BDE(N-O) = 201 \text{ kJ mol}^{-1}$; $BDE(N=O) = 607 \text{ kJ mol}^{-1}$ vs. $BDE(N-C) = 305 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $BDE(N=C) = 615 \text{ kJ mol}^{-1}$), ainda assim requer agentes redutores fortes para ser quebrada.^[75]



Esquema 3. Estruturas de ressonância de (a) iminas e (b) nitronas.

1-1.2. Nitronas e radicais

Nitronas são susceptíveis à oxidação via transferência de elétron acoplada a próton (PCET) ou transferência de um elétron (SET) levando a radicais nitroxila/nitróxido amplamente usados como blocos de construção de compostos nitrogenados.^[76] Nitróxidos podem também ser formados como adutos entre radicais e nitronas, contexto no qual são chamados de captadores de spin (em inglês, *spin traps*).^[77-79] Como resultado, o potencial antioxidante de nitronas é alto, fato que sustenta o seu uso como agente terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo,^[80-82] e são ferramentas importantes em estudos empregando espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron (EPR).^[83]

Antioxidantes com arcabouços originados de produtos naturais ajudam a reduzir o uso de compostos químicos obtidos de fontes não-renováveis e são altamente valorizados em química medicinal e na descoberta de medicamentos.^[84] Apesar de produtos naturais contendo o grupo nitrona serem escassos,^[85] metabólitos secundários podem ser usados como material de partida para a semissíntese de novas nitronas. Os derivados nitrona da ligustrazina, uma pirazina encontrada na erva Chinesa *Ligusticum wallichii* Franch., têm propriedades antioxidantes e

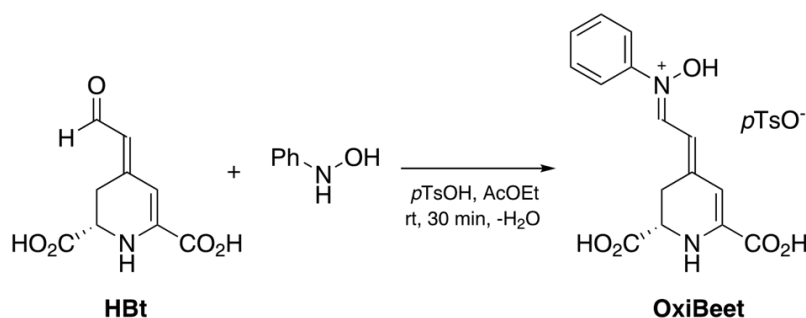
trombolíticas e são usados para o tratamento de derrame cerebral.^[82] Outro importante exemplo é a nitrona derivada do Trolox, um análogo solúvel em água da vitamina E, que apresenta alta capacidade antirradicalar e propriedades neuroprotetivas.^[86]

Ácido betalâmico pode ser obtido pela extração de suco de beterraba hidrolisado com acetato de etila.^[18] O acoplamento aldimínico entre o seu aldeído e aminas ou aminoácidos formando iminas (bases de *Schiff*) permitindo a modificação do esqueleto de betalainas em laboratório de modo a aproveitar ou aprimorar as suas características naturais. Betaínas nitrona podem ser obtidas pela reação entre ácido betalâmico e hidroxilaminas. As propriedades desses compostos inéditos são desconhecidas e sua potencial aplicação como antioxidantes e captadores de spin se associam à motivação de criar betalainas mais estáveis frente à hidrólise.

1-2. Resultados e discussão

1-2.1. Betaína-nitrona: semissíntese e caracterização estrutural

A etapa crítica para a síntese de betalainas é a obtenção de ácido betalâmico (HBt). Para essa semissíntese, esse aldeído foi extraído de suco de beterraba (*Beta vulgaris* L.) hidrolisado utilizando-se um método adaptado daquele desenvolvido por Schliemann e coautores.^[87] A reação entre ácido betalâmico e excesso de *N*-fenil-hidroxilamina (5 equiv.) foi realizada em acetato de etila acidificado com ácido *p*-toluenossulfônico (5 equiv.) e produziu uma betaína-nitrona chamada de OxiBeet com 50% de rendimento após a purificação por cromatografia em coluna de gel de Sephadex LH-20 com água como eluente (Esquema 4). Apesar de moderado, o rendimento final da síntese é pelo menos duas vezes maior do que o reportado para a semissíntese de betalainas.^[28,42] Como observado para diversas betalainas, a decomposição do produto durante a etapa de purificação reduz o rendimento da síntese.



Esquema 4. Semissíntese de OxiBeet. Reação entre ácido betalâmico (HBt) e *N*-fenil-hidroxilamina em acetato de etila na presença de ácido *p*-toluenossulfônico.

O produto foi analisado por HPLC-ESI-QToF-MS que revelou um sinal cromatográfico majoritário para uma espécie com tempo de retenção de 11,7 min. A análise por espectrometria de massas de alta resolução produziu um sinal com m/z 303,0973 que é condizente, junto à distribuição isotópica, com o calculado para o íon $[M+H]^+$ da OxiBeet (m/z calculado: 303,0975, erro: $-0,66$ ppm, Figura 2). Foi observado um sinal com m/z 605,1880 para uma espécie com carga 1+ que é compatível com o valor calculado para o íon $[2M-H]^+$ da OxiBeet (m/z calculado: 605,1878, erro: 0,33 ppm), sugerindo que existam agregados dessa betalaína.

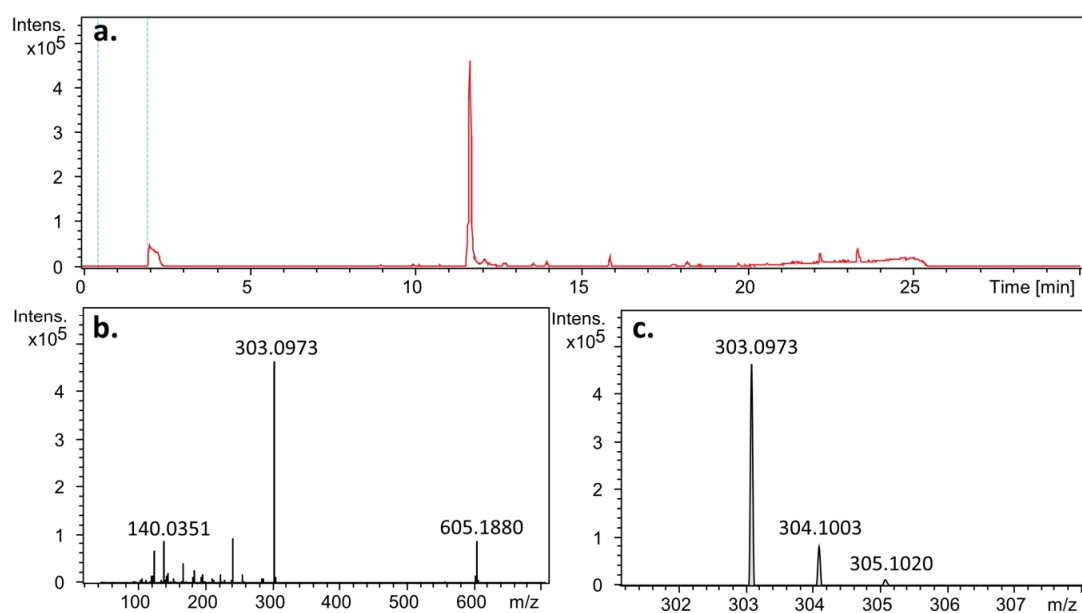


Figura 2. Análise da OxiBeet por HPLC-ESI(+)-QToF-MS. (a) Cromatograma de íons totais da OxiBeet. (b) Espectro de massas de alta resolução da espécie com tempo de retenção igual a 11,7 min. (c) Ampliação da região do sinal com m/z 303,0973 para visualização da distribuição isotópica.

OxiBeet foi caracterizada utilizando-se espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), o que indica boa persistência e solubilidade em D₂O. Experimentos de RMN tem aplicação limitada para estudar betalaínas devido à sua labilidade em meio aquoso e baixa solubilidade em solventes orgânicos.^[88,89] Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e ¹H, ¹³C-HSQC são apresentados na Figura 3, com as respectivas atribuições e acoplamentos. O espectro de ¹H, ¹³C-HMBC, também utilizado na atribuição dos sinais, pode ser encontrado no Anexo 2. A constante de acoplamento entre os átomos H7 e H8 da OxiBeet (³J_{H7,H8} = 10,4 Hz) é menor do que os valores tipicamente encontrados para betalaínas naturais (³J_{H7,H8} ~ 12 Hz).^[90,91] Esse resultado pode ser explicado considerando-se que a densidade de carga negativa do grupo O(H) estabiliza o N7 reduzindo a deslocalização eletrônica do sistema 1,7-diaza-heptametínio e diminuindo o caráter de dupla ligação entre o C7 e o C8. Os átomos H7 e C5 da OxiBeet estão

desblindados (1 ppm e 10 ppm, respectivamente) comparados com os da betanina e da indicaxantina, o que corrobora essa explicação.^[88,90]

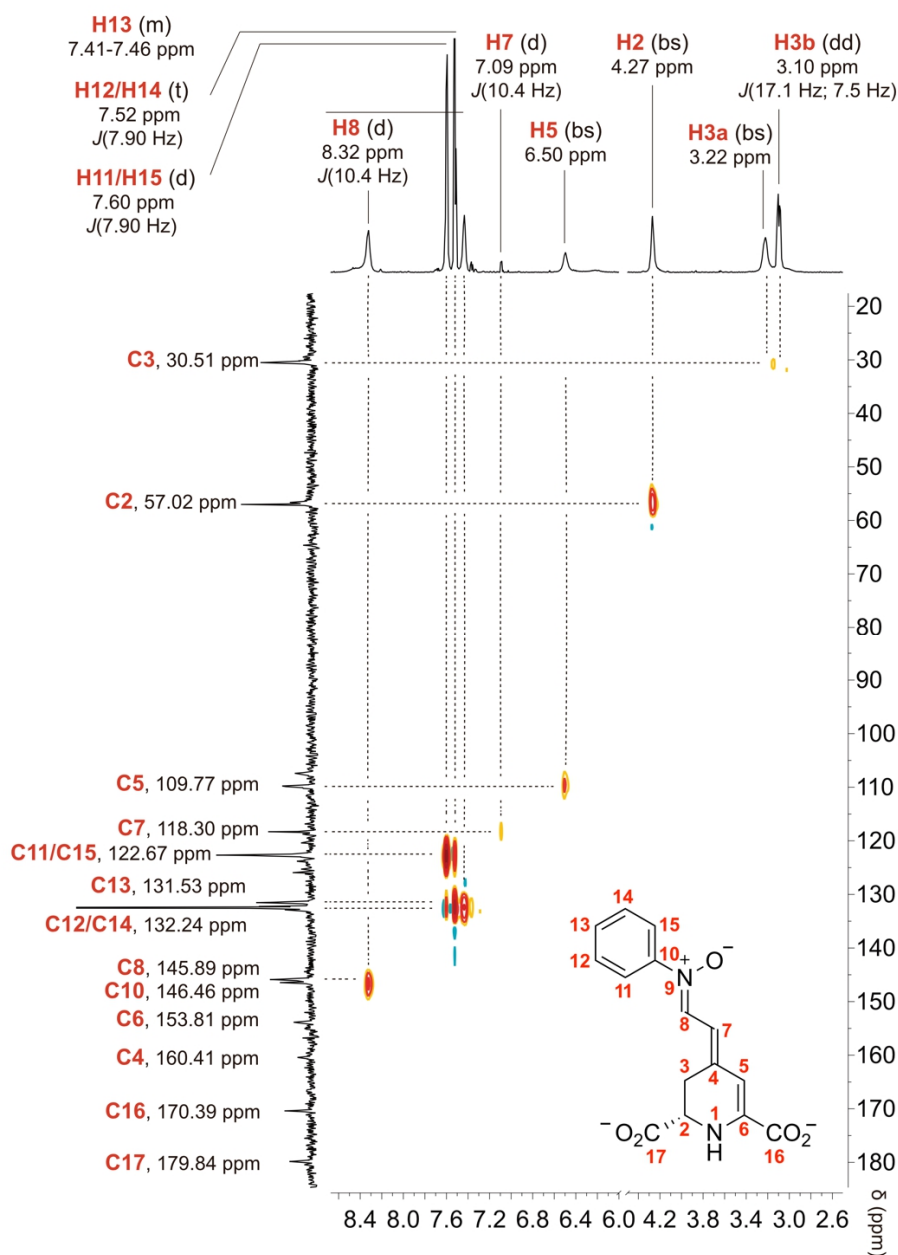


Figura 3. Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^1H , ^{13}C -HSQC (800 MHz para ^1H e 200 MHz para ^{13}C) da OxiBeet em D_2O a 15 °C. A numeração dos átomos é apresentada em vermelho. A atribuição dos sinais no espectro de RMN foi sustentada por cálculos de mecânica quântica empregando-se o método GIAO (*gauge-including atomic orbital*), a partir da estrutura do estereoisômero da OxiBeet com a ligação dupla C8=N9 na configuração Z (Anexo 3).

1-2.2. Propriedades de absorção UV-Vis e fluorescência da OxiBeet

Para aumentar o entendimento das propriedades eletrônicas da OxiBeet em meio aquoso,

as suas propriedades de absorção e fluorescência foram investigadas. Para compreender o efeito do grupo *N*-óxido sobre as propriedades fotofísicas de betalaínas, os dados obtidos foram comparados com os da pBeet, a betalaína derivada da reação entre HBt e anilina (Figura 4). Há um deslocamento hipsocrômico de 21 nm (856 cm^{-1}) do máximo de absorção da OxiBeet em relação ao da pBeet e um aumento na largura a meia altura da banda de absorção, sugerindo que a OxiBeet possa ser encontrada em diversos estados de protonação e/ou diversos isômeros e agregados estejam presentes em solução. Entretanto, há pouca diferença entre os espectros de fluorescência quando as amostras foram excitadas em 470 nm assim como nos espectros de excitação para emissão em 562 nm. Esses dados sugerem espécies emissivas semelhantes para OxiBeet e pBeet e corrobora a hipótese da presença de OxiBeet em diversas formas em solução.

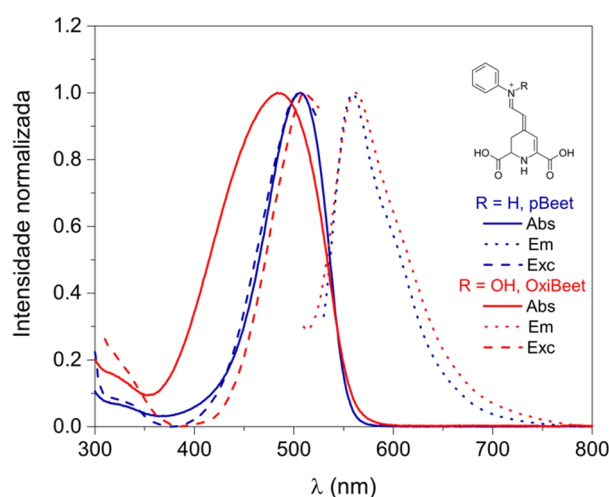


Figura 4. Espectros normalizados de absorção UV-Vis ($\lambda^{\text{Abs}} = 485\text{ nm}$, OxiBeet; 506 nm , pBeet), emissão ($\lambda^{\text{EX}} = 472\text{ nm}$, OxiBeet; $\lambda^{\text{EX}} = 497\text{ nm}$, pBeet) e excitação ($\lambda^{\text{EM}} = 562\text{ nm}$, OxiBeet; $\lambda^{\text{EM}} = 559\text{ nm}$, pBeet) da OxiBeet (vermelho) e da pBeet (azul) em água.

O coeficiente de absorção molar (ϵ) de betalaínas costuma ser determinado por um método do ponto final (*endpoint*)^[26] que consiste na hidrólise completa da betalaína e quantificação em relação ao ácido betalâmico ($\epsilon_{424\text{ nm}} = 27.000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).^[92] Esse método supera as dificuldades de se trabalhar com compostos higroscópicos, instáveis e em pequena quantidade (sub mg). Entretanto, como se pode observar na Figura 6, OxiBeet não se converte em ácido betalâmico em meio alcalino. Assim, optou-se por assumir que a reação entre ácido betalâmico e *N*-fenilhidroxilamina e ácido *p*-toluenossulfônico em excesso produzem OxiBeet quantitativamente e determinar o valor de ϵ utilizando a reação de formação, não de hidrólise, como feito anteriormente para a BeetBlue.^[60]

A reação foi acompanhada por absorção UV-Vis (Figura 5a). A presença do ponto

isobéstico entre as bandas da OxiBeet ($\lambda_{\text{máx}} = 500 \text{ nm}$) e do HBt ($\lambda_{\text{máx}} = 410 \text{ nm}$) e os valores semelhantes para a constante de decomposição de ácido betalâmico e de formação da OxiBeet (Figura 5b, $k_{\text{obs}} = 3,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $3,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), indicam que os processos estão relacionados. O monitoramento da reação por HPLC mostrou que o HBt é totalmente consumido. O coeficiente de absorção molar da OxiBeet em pH 2,6 é $\epsilon_{502 \text{ nm}} = 42203 \pm 2466 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor similar ao encontrado para betaxantinas naturais ($48000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[26,93] Os valores de ϵ da OxiBeet em função do pH foram calculados a partir das variações observadas na titulação (Figura 5c, Tabela 3).

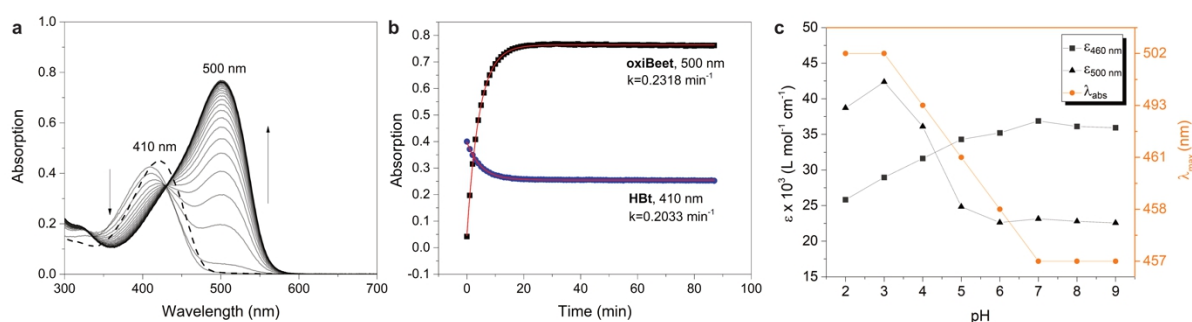


Figura 5. Determinação do coeficiente de absorção molar da OxiBeet. (a) Espectros de absorção em função do tempo da reação entre ácido betalâmico e *N*-fenilhidroxilamina com ácido *p*-toluenosulfônico em água pH 2,6. A absorção inicial do HBt é representada pela linha pontilhada; (b) Cinética de formação da OxiBeet (500 nm) e consumo de HBt (410 nm). As linhas vermelhas são os ajustes exponenciais das curvas. (c) Coeficiente de absorção molar da OxiBeet em $\lambda_{\text{abs}} = 460 \text{ nm}$ (■) e $\lambda_{\text{abs}} = 500 \text{ nm}$ (▲) em função do pH (em preto). A dependência do máximo de absorção em função do pH é apresentada em laranja (●).

Tabela 3. Dependência do comprimento de onda de absorção máximo e do coeficiente de absorção molar da OxiBeet com o pH do meio.

pH	λ^{max} (nm)	$\epsilon_{500 \text{ nm}}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\epsilon_{460 \text{ nm}}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
2,0	502	38724	25836
2,6	502	42203	28588
3,0	502	42375	28962
4,0	493	36110	31623
5,0	461	24846	34301
6,0	458	22625	35215
7,0	457	23148	36895
8,0	457	22796	36122
9,0	457	22568	35939

Para entender melhor o papel dos equilíbrios de protonação sobre as propriedades eletrônicas da OxiBeet o composto foi titulado. Deve-se destacar que não existem na literatura dados concretos sobre o pK_a dos grupos carboxílicos de betalainas, apenas dois relatos experimentais indicando valores finais para betanina ($pK_a^{COOH} = 3,4$, $pK_a^{OH} = 8,5$ experimental)^[21] e indicaxantina ($pK_a^{COOH} = 3,3$)^[94]. Essa dificuldade se relaciona à disponibilidade limitada de material e à labilidade de betalainas em água. Os pK_a s da OxiBeet e da pBeet foram determinados monitorando-se os espectros de absorção UV-Vis e de fluorescência durante a titulação. Os espectros foram adquiridos imediatamente após a diluição de uma alíquota de uma solução estoque da betalaina em água em solução tampão Britton-Robinson com pH entre 2 e 12 (Figura 6, Anexo 4).

Para os dois compostos, há a contribuição de duas bandas de absorção com máximos bem definidos que se somam para produzir os espectros observados. Para a pBeet, a absorção em meio ácido com pH 2 é máxima em 505 nm. Conforme a pBeet vai sendo hidrolisada em pH mais alto, observa-se o surgimento de uma banda com máximo em 412 nm e um ponto isobéstico em 451 nm. A OxiBeet apresenta uma banda de absorção com máximo em 503 nm em meio aquoso pH 2 e um ombro em aproximadamente 440 nm. Com o aumento do pH, a banda se alarga e o máximo de absorção se desloca para 458 nm (a partir de pH 5) pelo aumento da absorção na região do azul. Esse resultado suporta que a forma protonada de OxiBeet ($\lambda^{ABS} = 503$ nm) é mais emissiva que a forma com λ^{ABS} igual a 458 nm e explica o dado apresentado na Figura 4.

A sobreposição dos espectros de absorção e de excitação da pBeet indica que a espécie excitada é a emissora ($\lambda^{EM} = 558$ nm). A intensidade de emissão aumenta com o aumento do pH entre 2 e 4 e diminui a partir de pH 8, devido ao início da hidrólise da pBeet (Figura 6). A emissão da OxiBeet ($\lambda^{EM} = 562$ nm) aumenta de pH 2 até 4, como observado para a pBeet, mas diminui até não haver mais fluorescência a partir de pH 6, no qual há predominância da espécie que absorve em 458 nm (Figura 6 e Anexo 4). Assim, os pK_a s de pBeet e OxiBeet foram determinados através do ajuste não-linear das curvas das intensidades de emissão de fluorescência no λ_{max}^{Em} em função do pH empregando-se uma função sigmoide. Optou-se pela análise da variação da fluorescência em função do pH ao invés da variação da absorção dada a maior sensibilidade da técnica.

Os pK_a s experimentais da pBeet são 2,6, 3,4 e 7,2 (Figura 6). A inflexão em pH 9,3 corresponde ao pK para a hidrólise da pBeet. Os pK_a s dos ácidos carboxílicos são 2,6 (C-6) e 3,4 (C-2), valores próximos aos relatados para betanina ($pK_a = 3,4$, experimental)^[21] e ácido betalâmico ($pK_a = 1,2$ (C-6) e 3,2 (C-2), determinados por cálculo teórico),^[24] enquanto o

$pK_a = 7,2$ pode se referir ao equilíbrio de dissociação ácida do grupo imínio. Foram determinados apenas dois pK_a s para a OxiBeet: 2,4 e 4,4 (Figura 6). O pK_a 2,4 pode corresponder aos dois grupos ácido carboxílico, caso os valores de pK_a s sejam tão próximos que não seja possível distinguir entre eles. Considerando-se o efeito do pH sobre a fluorescência e absorção de OxiBeet em comparação à pBeet, o pK_a 4,4 deve corresponder ao equilíbrio ácido-base que envolve a hidroxila da nitrona e não um grupo carboxílico. Após a desprotonação da hidroxila da porção nitrona da OxiBeet, a betalaína passa a absorver no azul por conta da menor deslocalização eletrônica do sistema 1,7-diaza-heptametínio, como inferido na análise dos dados de RMN, e deixa de ser fluorescente (Anexo 4a).

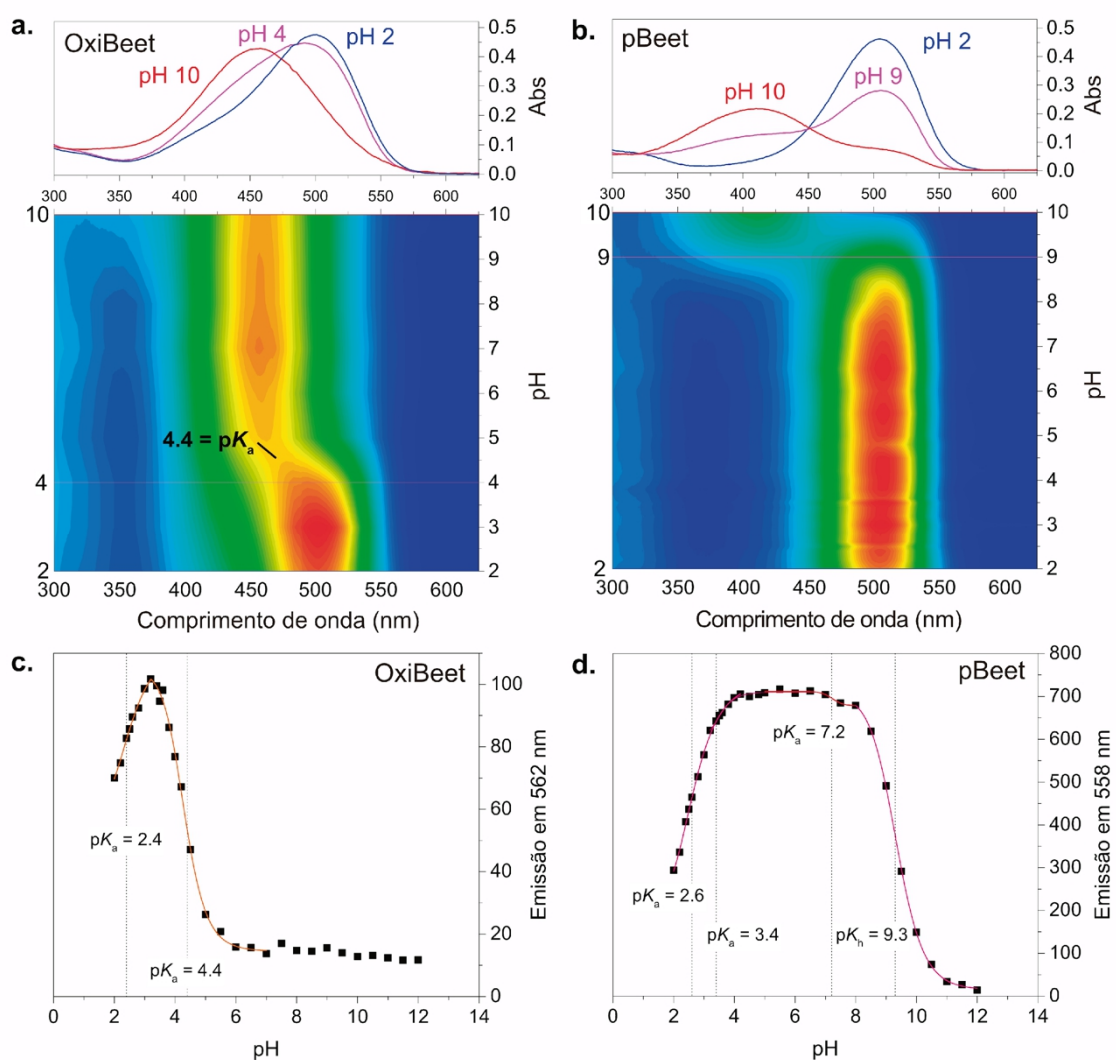


Figura 6. Titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica da pBeet e da OxiBeet. Gráficos de contorno dos espectros de absorção da (a) OxiBeet e da (b) pBeet em função do pH e projeções dos espectros de absorção UV-Vis em pHs selecionadas. Curva de titulação da (c) OxiBeet ($\lambda^{EX} = 460$ nm) e da (d) pBeet ($\lambda^{EX} = 500$ nm) obtida a partir dos dados de fluorescência. As linhas vermelhas são os ajustes lineares usados para determinação dos valores de pK_a apresentados.

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{fl}) da OxiBeet protonada foi determinado em pH 3 utilizando-se rodamina B em metanol como padrão secundário de fluorescência ($\phi_{Fl} = 0,7$)^[95]. O ϕ_{Fl} da OxiBeet é $(6,1 \pm 0,4) \times 10^{-4}$ é baixo e similar àquele de betanina ($\phi_{Fl} = 7,0 \times 10^{-4}$)^[96] e da quasibetalaína BeetBlue^[60]. O efeito do pH sobre o rendimento quântico da OxiBeet é apresentado na Tabela 4. Em meio neutro pH 7, a OxiBeet é uma ordem de grandeza menos fluorescente que a pBeet. A *N*-metil pBeet tem ϕ_{Fl} mais baixo do que a pBeet ($5,6 \times 10^{-4}$)^[19] mas ainda assim é 4 vezes maior do que o ϕ_{Fl} da OxiBeet confirmando que grupos doadores de elétrons ligados ao nitrogênio imínico comprometem a fluorescência de betalaínas.^[19,62]

Tabela 4. Rendimentos quânticos relativos da OxiBeet e da pBeet em função do pH.

pH	ϕ_{Fl} OxiBeet / 10^{-4}	ϕ_{Fl} pBeet / 10^{-4}
2	5,7	6,8
3	6,1	11,4
4	4,4	14,3
5	1,8	14,5
6	1,4	14,5
7	1,1	14,7
8	1,3	15,9
9	1,4	- ^a
10	1,2	-
11	1,2	-
12	1,2	-

^a O experimento não pode ser realizado por causa da hidrólise da pBeet nessas condições.

Experimentos de absorção transiente ultrarrápida na escala de femtosegundos foram realizados durante um estágio BEPE de um ano na Universidade de Uppsala no grupo do Prof. Jacinto Sá para investigar o comportamento da OxiBeet no estado eletronicamente excitado. Em água equilibrada com ar, a excitação da OxiBeet em 485 nm provoca o branqueamento do estado fundamental (*ground state bleaching*), evidenciado pela banda negativa em 520 nm (Figura 7). Observa-se o aparecimento de uma banda de absorção positiva em 450 nm, atribuída a absorção do primeiro estado excitado singlete ($S_1 \rightarrow S_n$; $n > 1$) e de uma banda de absorção negativa centrada em aproximadamente 625 nm que foi atribuída a emissão estimulada ($S_1 \rightarrow S_0$). A completa recuperação do estado fundamental em menos de 100 ps após a fotoexcitação está de acordo com os resultados relatados para betanina.^[97] Não se observa a ocorrência de cruzamento intersistema (ISC) nem a formação de fotoprodutos em quantidades consideráveis.

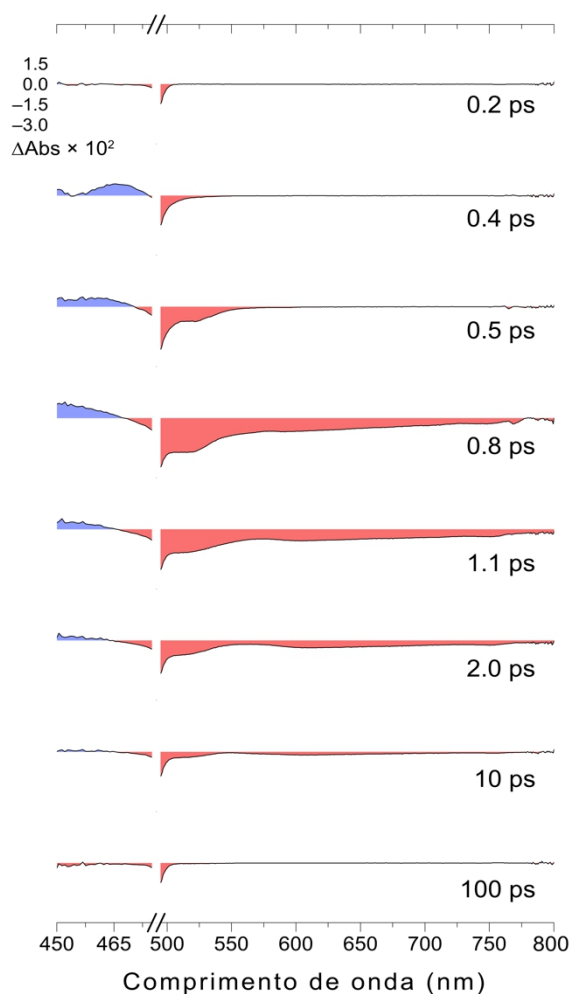


Figura 7. Espectro de absorção transiente da OxiBeet em água; λ_{pump} : 485 nm.

1-2.3. Estabilidade da OxiBeet frente à hidrólise

O efeito do pH sobre a estabilidade da OxiBeet em solução aquosa mantida a 60 °C foi investigado adquirindo-se espectros de absorção UV-Vis em função do tempo. Os experimentos foram feitos em tampão Britton-Robinson na faixa de pH entre 2 e 9 e os resultados foram comparados com os obtidos para pBeet. Na Figura 8, observa-se o comportamento da OxiBeet em meio ácido pH 2 e em meio alcalino pH 9; os dados brutos e cinéticas em outros pHs podem ser encontradas nos Anexos e . As constantes cinéticas observadas listadas na Tabela 5 foram determinadas pelo ajuste não linear dos dados.

Em meio ácido, OxiBeet e pBeet se comportam de modo similar: há a diminuição da banda de absorção ao redor de 500 nm e o aparecimento de uma banda de absorção em 405 nm, correspondente ao HBt. Contudo, a decomposição da OxiBeet é duas vezes mais lenta do que a de pBeet ($k_{\text{obs}} = 5,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. $1,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e se observa a decomposição do HBt, através da diminuição da absorção em 405 nm em tempos mais longos. Em meio alcalino (representado

pelo pH 9 na Figura 8), enquanto pBeet desaparece rapidamente ($k_{\text{obs}} = 5,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) junto ao surgimento de uma banda em 428 nm atribuída ao HBt, a OxiBeet se decompõe lentamente ($k_{\text{obs}} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), sem que haja a formação de uma nova banda com absorção no intervalo de comprimento de onda monitorado. Devido à impossibilidade de acompanhar a cinética até a decomposição completa da betalaína, os ajustes exponenciais em meio neutro e alcalino foram realizados fixando-se o valor de y_0 em zero (inserto na Figura 8b e no Anexo 6).

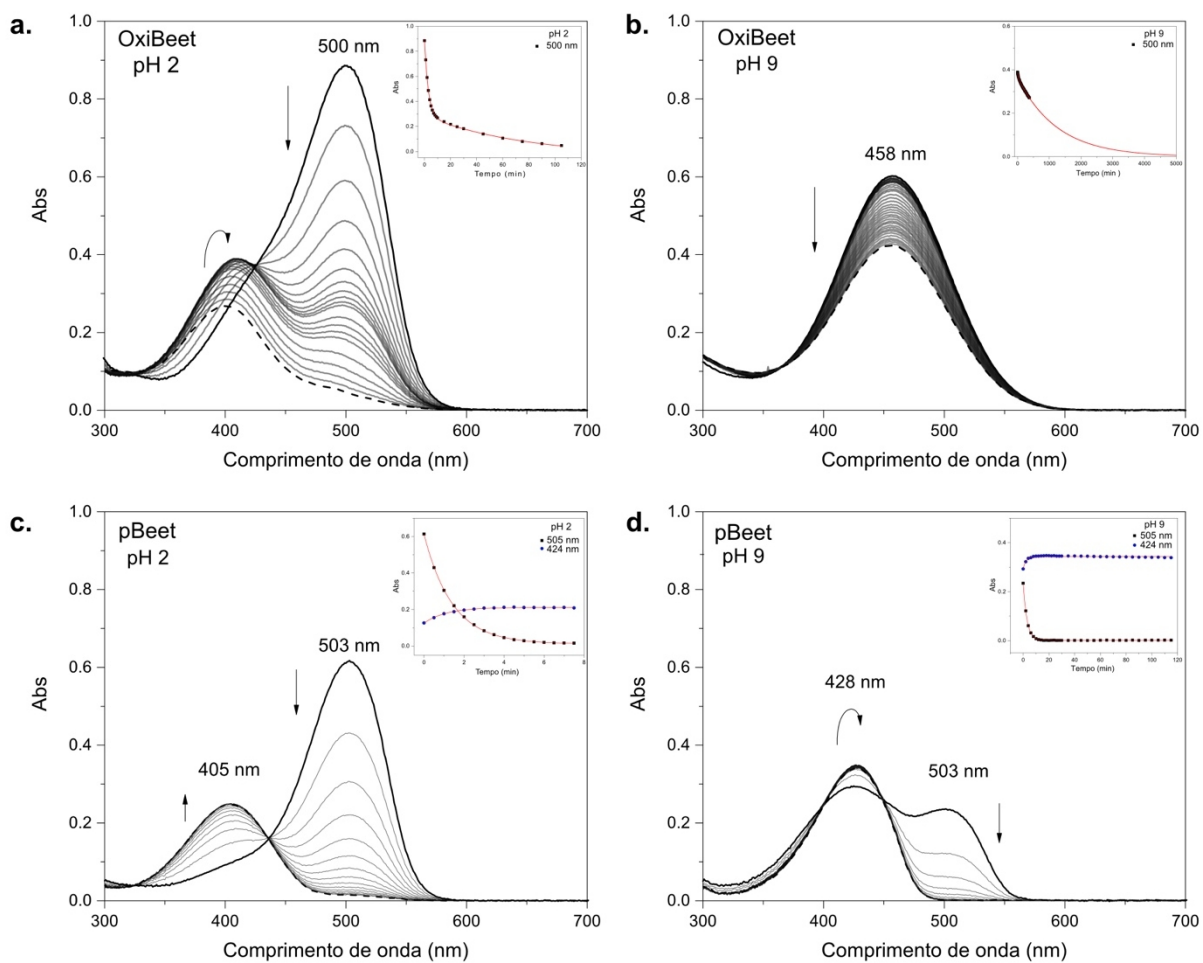


Figura 8. Espectros de absorção de OxiBeet e pBeet em meio aquoso e curvas cinéticas correspondentes (insertos). OxiBeet em pH 2 (a) e pH 9 (b) e pBeet em pH 2 (c) e pH 9 (d) em solução tampão Britton-Robinson a 60 °C.

Tabela 5. Dados cinéticos da decomposição da OxiBeet e pBeet em tampão Britton-Robinson a 60 °C.

	OxiBeet		pBeet	
pH	$k_{\text{obs}} / 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$\tau_{1/2} / \text{s}$	$k_{\text{obs}} / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$\tau_{1/2} / \text{s}$
2	53 ± 7	131	12 ± 0,7	57
3	18 ± 1	393	2,6 ± 0,1	263
4	4,8 ± 1,3	1435	1,0 ± 0,1	714
5	1,5 ± 0,6	4601	0,7 ± 0,1	1024
6	0,6 ± 0,2	11782	0,7 ± 0,1	1007
7	0,3 ± 0,2	20794	1,0 ± 0,1	674
8	0,2 ± 0,1	40773	2,7 ± 0,1	254
9	0,2 ± 0,1	45021	5,1 ± 0,1	135

A comparação do efeito do pH sobre o valor de k_{obs} a 60 °C para OxiBeet, pBeet e Bn^[22] é apresentada na Figura 9. Para pBeet e Bn, o gráfico de $\log k_{\text{obs}}$ vs. pH tem o formato de sino típico da hidrólise de iminas catalisadas por ácido ou base.^[44] Entretanto, existem algumas diferenças na curva da OxiBeet. Em meio ácido com $\text{pH} \leq 4$ o perfil de hidrólise é idêntico ao da pBeet e da betanina, com valores de k_{obs} próximos aos da pBeet, mostrando que ambos os compostos são sujeitos a decomposição catalisada por ácido e que, nessa condição, o efeito da hidroxila da nitrona na estabilização é pequeno. Já em condições neutras e levemente alcalinas, OxiBeet é muito mais estável do que betanina e pBeet, indicando que a desprotonação da nitrona desfavorece a ocorrência de hidrólise, mesmo em condições básicas. Essa explicação é corroborada por cálculos de cargas parciais feitos no grupo que mostram uma localização de carga negativa no N1 do sistema 1,7-diaza-heptametínio, de acordo com os dados de espectroscopia de RMN e absorção apresentados anteriormente (Figura 9b).

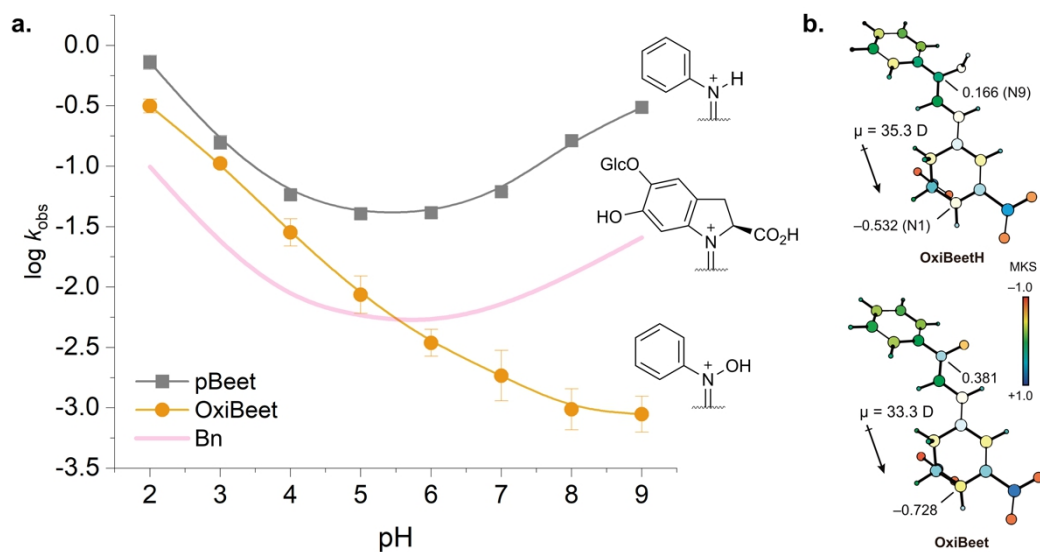
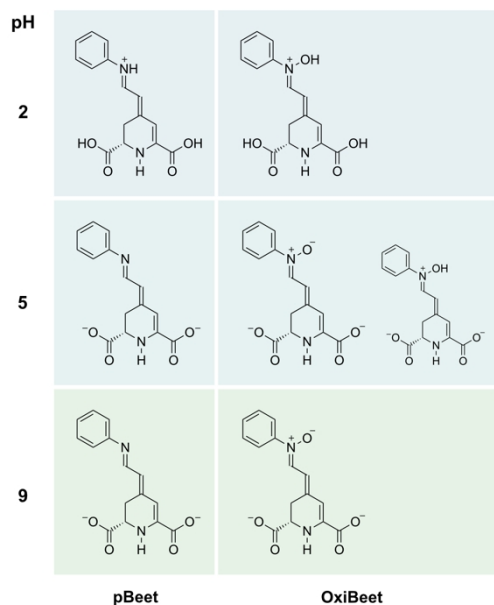


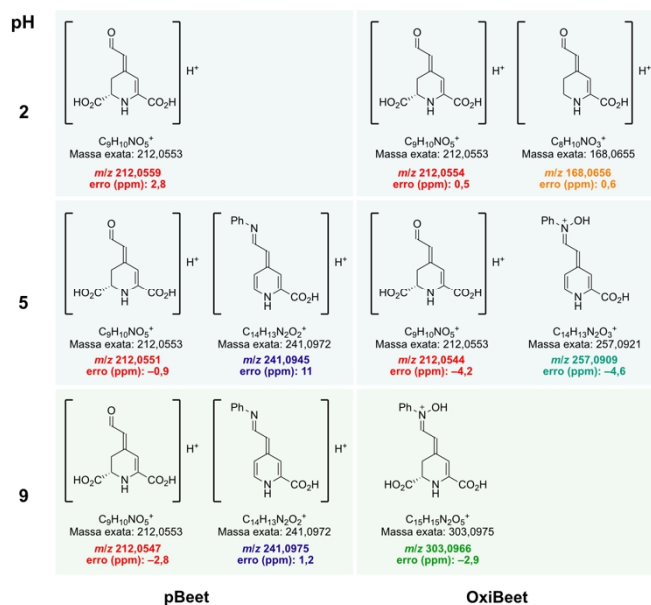
Figura 9. Efeito do pH sobre a decomposição de OxiBeet a 60 °C. (a) Efeito do pH no logaritmo das constantes observadas (k_{obs} , min^{-1}) para a decomposição da OxiBeet e pBeet e dados para a betanina, reproduzidos da Ref. [16]. (b) Cargas parciais dos átomos de nitrogênio da OxiBeet e da sua forma protonada na nitrona (N-OH, OxiBeetH) calculados de acordo com o modelo de Merz-Kollman-Singh (MKS).

Para entender mais profundamente o comportamento da OxiBeet em diferentes pHs, foram realizadas análises de HPLC-ESI-QToF-MS e os dados foram comparados com os de pBeet. O Esquema 5 mostra as espécies químicas principais em solução em cada pH considerando-se os pK_a s determinados anteriormente (Figura 6) e os produtos de decomposição detectados por espectrometria de massas de alta resolução em modo positivo. O produto de hidrólise, ácido betalâmico (m/z 212,0559), é observado na decomposição da pBeet em todos os pHs e da OxiBeet nos pHs 2 e 5 (Anexo 9 a 12). Em pH 5 e 9, a pBeet é descarboxilada e aromatizada (produto com m/z 241,0975), sugerindo que a via de monodescarboxilação oxidativa concorre com a de hidrólise quando as porções ácido carboxílico estão desprotonadas. Para a OxiBeet, observa-se a formação de ácido betalâmico e o ácido betalâmico descarboxilado (m/z 168,0656) em meio ácido pH 2. Em pH 5, os principais produtos de decomposição da OxiBeet são o ácido betalâmico e a OxiBeet monodescarboxilada oxidada (m/z 257,0909), produtos análogos aos observados para a decomposição de pBeet nesse pH. Produtos com m/z 330,1232 e 364,1297 também foram detectados, mas não foi possível atribuir uma estrutura correspondente a essas massas. Em pH 9, apenas OxiBeet foi identificada. É possível que os produtos de decomposição da OxiBeet não tenham sido formados em quantidade suficiente para detecção ou que não possuam carga positiva.

(a) Espécies principais em solução



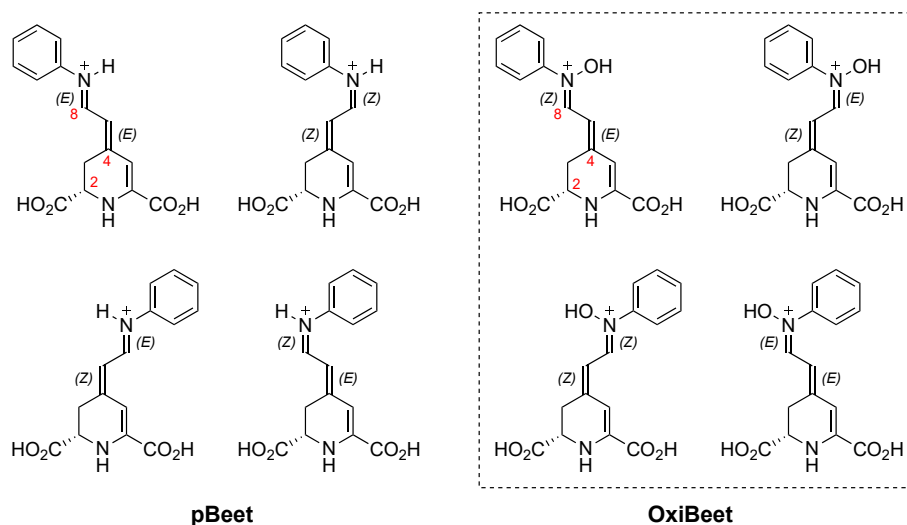
(b) Produtos de decomposição, HPLC-ESI(+)-QToF-MS



Esquema 5. Produtos de decomposição da pBeet e da OxiBeet em pH 2, 5 e 9 a 60 °C, determinados por HPLC-ESI-QToF-MS em modo positivo. Os espectros de massas podem ser encontrados nos Anexos, 11 e 12.

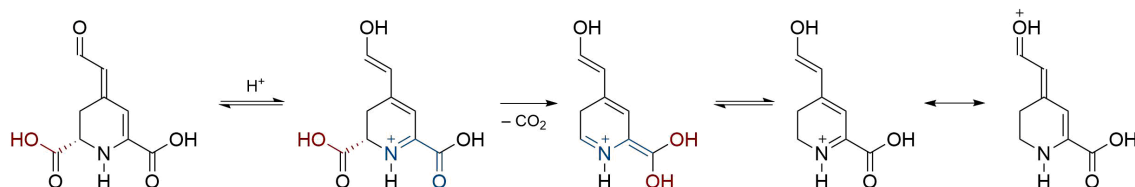
Para racionalizar esses resultados, deve-se considerar que:

- a) pBeet e OxiBeet têm diversos estereoisômeros e as estruturas (4*E*, 8*Z*)-OxiBeet e (4*E*, 8*E*)-pBeet apresentadas no Esquema 5 são arbitrárias. A isomerização *Z/E* de iminas em meio ácido é bastante estudada e ocorre com assistência da água.^[98] Contudo, assume-se que a configuração absoluta do C2 do ácido betalâmico é *S*.



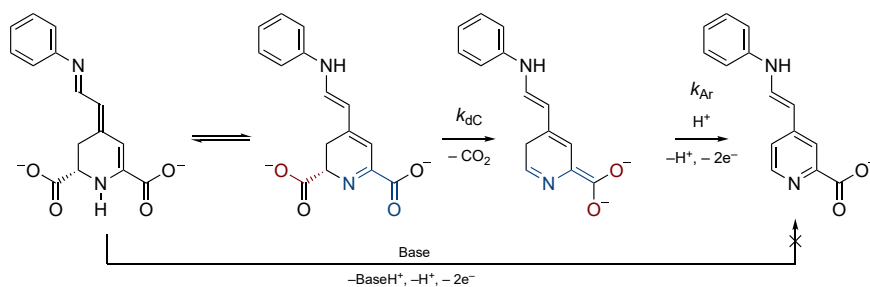
Esquema 6. Estereoisômeros selecionados da pBeet e da OxiBeet.

b) A descarboxilação do ácido betalâmico em meio ácido pH 2, no qual as duas carboxilas estão protonadas, pode ocorrer considerando-se que o grupo carboxílico ligado ao C sp^2 é elétron atraente e atua como *electron sink* (Esquema 7).



Esquema 7. Possível mecanismo de descarboxilação considerando um par de elétrons n do oxigênio do grupo ácido carboxílico como centro de doação de densidade eletrônica negativa (em vermelho) e o grupo iminoácido protonado como elétron sacador (*electron sink*, em azul). Como o pK_{aH} de aldeídos é menor que zero, o meio pode ser ácido o suficiente para manter os grupos carboxílicos protonados, mas gerar o enolato do ácido betalâmico ao invés do enol.

Assim, em meio ácido pH 2, como a hidrólise de pBeet e para a OxiBeet são amplamente favorecidas sobre a descarboxilação da betalaína (Esquema 5) a presença de ácido carboxílico descarboxilado na decomposição de OxiBeet sugere que a hidrólise mais lenta em comparação com a pBeet levou a tempos de monitoramento mais longos, o que permitiu que o ácido betalâmico fosse descarboxilado. Em pH 5, a hidrólise se torna mais lenta e a via de descarboxilação oxidativa se torna competitiva para as duas betalaínas (Esquema 8). Em meio alcalino pH 9, esse comportamento se mantém para a pBeet, enquanto a OxiBeet não sofre degradação visto que a estabilização da carga positiva no N9 previne a ocorrência de hidrólise e descarboxilação oxidativa dado que o sistema sacador de elétrons é enfraquecido. Destaca-se que a via direta de aromatização via eliminação de hidreto não resulta em descarboxilação e, portanto, propõe-se que a tautomerização para formação do sistema iminoácido seja necessária para produzir o grupo *electron sink* que é necessário para a ocorrência de descarboxilação oxidativa.



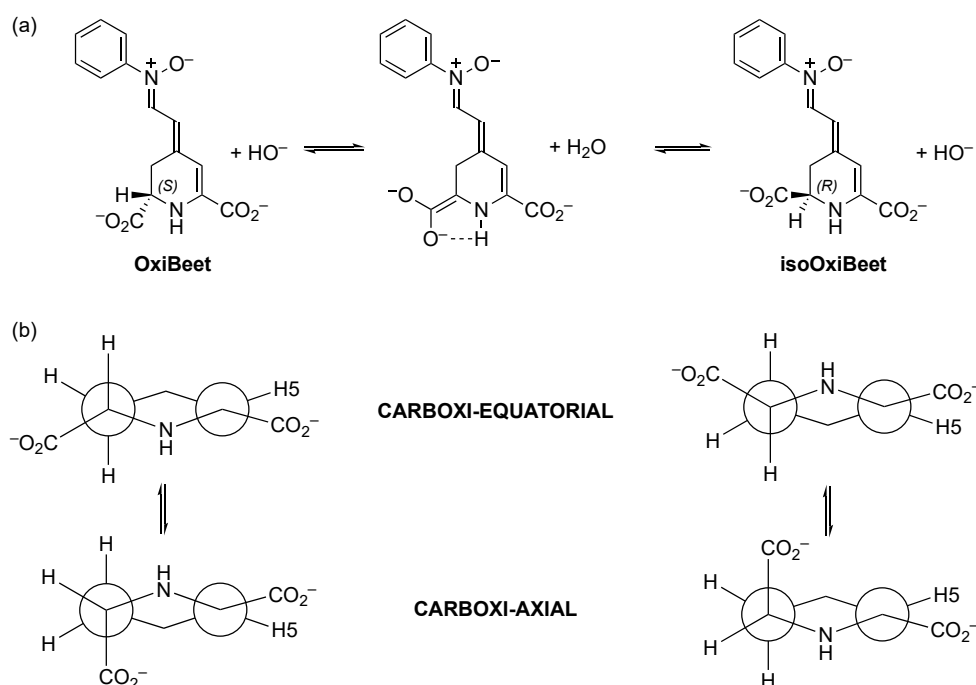
Esquema 8. Decomposição de pBeet em meio levemente ácido pH 5.

Para entender melhor o comportamento da OxiBeet em meio alcalino, foram adquiridos espectros ^1H , ^1H -COSY e ^1H , ^1H -NOESY da sua solução em $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ pD 9. Os espectros da OxiBeet apresentam sinais compatíveis com o padrão de acoplamento típico do anel 1,2,3,4-tetra-hidropiridínio de betalaínas, *i.e.*, H2 e os hidrogênios diastereotópicos H3a e H3b, H5 como singlete e sistema H7/H8. É notável que o espectro de RMN de ^1H (500 MHz) adquirido em pD 9 para ser usado como projeção dos espectros bidimensionais tem sinais muito mais bem resolvidos que o espectro de RMN de ^1H da solução em D_2O adquirido em equipamento operando em frequência de 800 MHz (Figura 3). Contudo, todos os sinais estão duplicados, indicando a presença de dois diastereoisômeros com troca química lenta em solução (Figura 10 e Figura 11). Observa-se no espectro de COSY o acoplamento do H8 em 8,38 ppm com o H7 em 6,22 ppm e do H8' em 8,21 ppm com o H7' em 6,54 ppm (Figura 10). As constantes de acoplamento dos dois conjuntos de H8/H7 são similares ($^3J(\text{H8}/\text{H7}) = 10,79$ Hz e $^3J(\text{H8}'/\text{H7}') = 10,97$). Os sinais correspondentes ao H3a e H3b também estão duplicados e bem resolvidos, mas há certa sobreposição entre os vários dubletos, o que dificulta a atribuição dos diferentes conjuntos de H. Os acoplamentos entre H2 e H3a/H3b também foram observados (Figura 10).

O experimento de NOESY da OxiBeet em pD 9 revelou que os sinais cruzados referentes aos H7/H7' e H5/H5' pela análise por espectroscopia de troca (EXSY, do inglês *exchange spectroscopy*) podem ser explicados considerando-se a dinâmica de isomerização, de forma análoga ao que foi feito no estudo da indicaxantina e miraxantina.^[88,99] Embora existam quatro possíveis diastereoisômeros (considerando-se as configurações das duplas ligações exocíclicas do sistema 1,7-diaza-heptametínio) são observados apenas dois conjuntos de sinais que se referem a apenas dois isômeros, ou conjuntos de isômeros com sinais médios, cuja interconversão é lenta considerando-se a diferença em Hz das ressonâncias dos núcleos de cada um dos isômeros (resolução temporal do RMN no experimento). Em outras palavras, pode ser que apenas dois diastereoisômeros estão presentes em solução ou que a conversão entre os diastereoisômeros pode ser rápida para um par e lenta para outro em relação à escala temporal do RMN nas condições do experimento levando a dois conjuntos de sinais médios.

A proximidade espacial entre H8 ou H8' e H11/15 indica que a configuração da ligação C8=N9 deve ser *Z* para ambos os isômeros (*vide* Esquema 6 e Figura 10). Entretanto, ambos os hidrogênios H8 interagem com H3, o que indica que a ligação C4=C7 deve possuir configuração *E*. Se os dois isômeros possuem a mesma configuração 4*E*, 8*Z* nas ligações duplas do sistema 1,7-diaza-heptametínio o resultado pode ser explicado considerando-se a racemização da OxiBeet em meio alcalino pela enolização do grupo ácido carboxílico, dando

origem ao estereoisômero na forma *iso* (Esquema 9), como bastante conhecido no caso de racemização de aminoácidos.^[100] Esse é um exemplo de notável complexidade em termos estereoquímicos visto que a grande diferença nos deslocamentos entre os sinais de RMN observados pode estar relacionada também aos equilíbrios conformacionais dos dois anéis porque as formas carboxi-axial e carboxi-equatorial de ambos os estereoisômeros induzem conformações diferentes no anel 1,2,3,4-tetra-hidropiridínio (Esquema 9). A racemização de betalaínas naturais em meio aquoso ácido é conhecida.^[58] Contudo, a ocorrência de isomerização da OxiBeet apenas em meio alcalino indica que a desprotonação dos ácidos carboxílicos deva favorecer a isomerização, fato que não pode ser investigado com betalaínas naturais dada a ocorrência de hidrólise.



Esquema 9. Proposta para a racemização de OxiBeet em meio alcalino pD 9. (a) Enolização do ácido carboxílico na posição 2 catalisada por base; pode haver protonação dessa espécie, assim como assistência de um grupo que estabilize a carga negativa. (b) equilíbrio conformacional do anel 1,2,3,4-tetra-hidropiridínio para OxiBeet e seu enantiômero, isoOxiBeet.

Os espectros de RMN da pBeet em função do pH estão apresentados no Anexo 13 e não mostram a presença de isômeros.

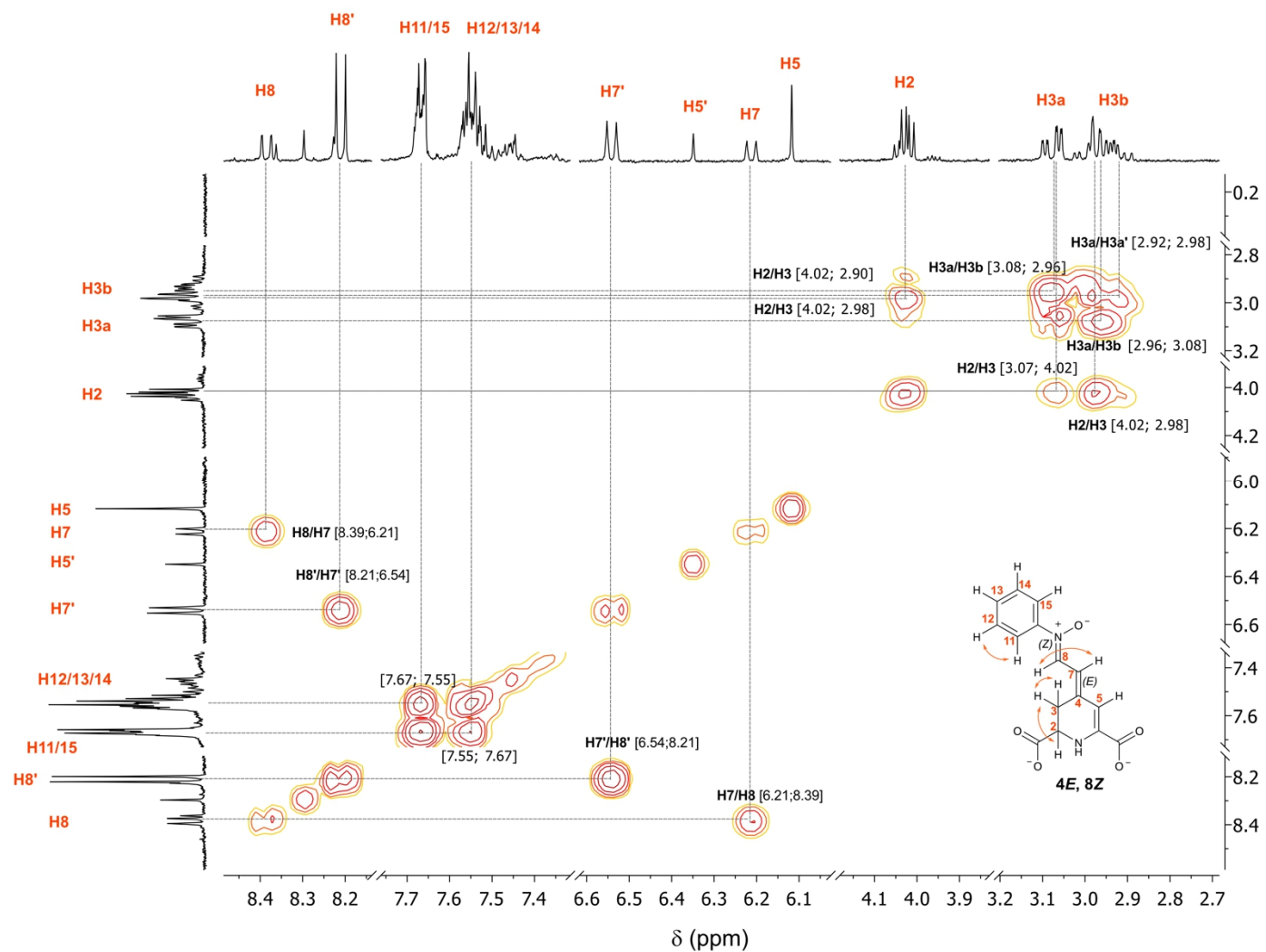


Figura 10. Espectros de ^1H , ^1H -COSY da OxiBeet, obtido em D_2O , pD 9 ajustado com NaOD, a 25 °C, 500 MHz.

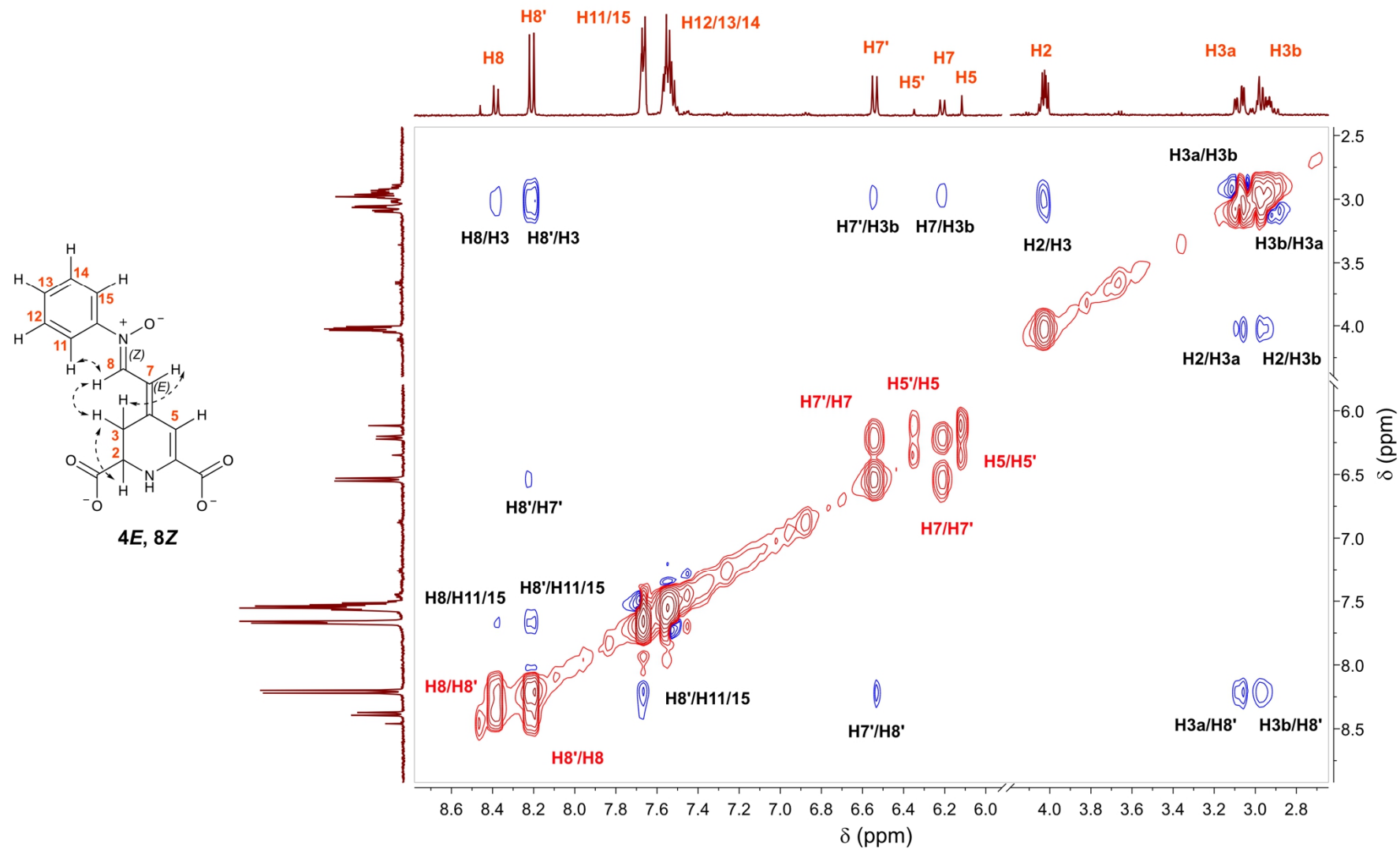


Figura 11. Espectros de ¹H, ¹H-NOESY da OxiBeet, obtido em D₂O a 25 °C, em pD 9 ajustado com NaOD, empregando a seqüência de pulsos *noesyegpph* (500 MHz).

1-2.4. Capacidade antirradicalar e oxidação

Após a caracterização estrutural da OxiBeet, foi investigado o seu potencial como antioxidante. Para isso, a capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox (TEAC) da OxiBeet foi determinada usando o método de branqueamento do radical cátion do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS^{•+}). Para a determinação do TEAC por esse método, persulfato de potássio é adicionado a uma solução de ABTS, que é parcialmente oxidado ao radical cátion ABTS^{•+}. A conversão do ABTS em ABTS^{•+} pode ser observada pela mudança da coloração verde para azul. Após a formação do ABTS^{•+}, são adicionadas diferentes concentrações da solução estoque de antioxidante e a redução do ABTS^{•+} é acompanhada por espectroscopia de absorção UV-Vis por 6 min. O TEAC é calculado a partir da comparação da diminuição da absorção do ABTS^{•+} em 734 nm antes e depois da adição do antioxidante em comparação ao efeito do Trolox. A relação entre os coeficientes angulares dos gráficos da variação de absorção em 734 nm em função da concentração de antirradical ou Trolox fornece o valor do TEAC.^[28,101]

A capacidade antirradicalar da OxiBeet e da pBeet foi determinada em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ em pH 7,4. O gráfico da variação da absorção em 734 nm (Δ Abs) após 6 min de reação em função da concentração de antioxidante é apresentado na Figura 12a. As capacidades antirradicalares determinadas usando o método TEAC/ABTS^{•+} são idênticas (TEAC = 3,8 ± 0,1), que é maior do que os de antioxidantes bem conhecidos como o ácido gálico, vitamina C, vitamina E, e muitos flavonóides.^[102,103]

O potencial de oxidação da OxiBeet e da pBeet foi determinado por voltametria cíclica em soluções aquosas, contendo KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito. O experimento foi realizado em um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, com um contraeletrodo de platina e um eletrodo de referência de Ag|AgCl. Os voltamogramas cíclicos da OxiBeet e da pBeet são apresentados na Figura 12b. A oxidação do sistema 1,7-diaza-heptametínio da OxiBeet ocorreu a um potencial muito menor do que o de outras betaláinas^[104], incluindo pBeet^[19], como evidenciado pela intensa resposta anódica irreversível a 357 mV vs. Ag|AgCl. Além disso, a nitrona OxiBeet foi oxidada reversivelmente para o correspondente nitróxido (potencial anódico, E_{pa} = 166 mV; potencial catódico, E_{pc} = 78 mV; potencial e meia-onda, $E_{1/2}$ = 124 mV). Apesar de ser não-fenólica, OxiBeet é um agente redutor potente.

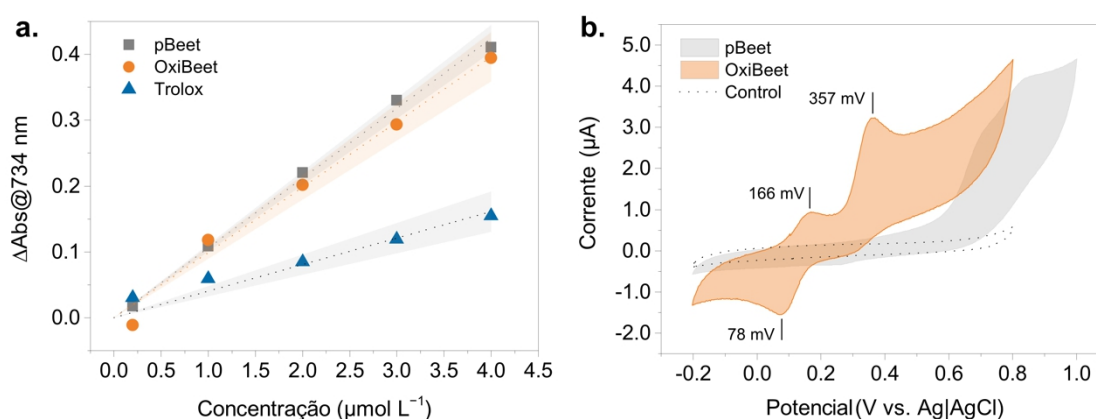


Figura 12. (a) Mudança na absorvância (ΔAbs) do ABTS^{++} em 734 nm após 6 min de reação em função da concentração de antioxidante para OxiBeet, pBeet e Trolox em tampão fosfato (pH 7,4; 50 mmol L^{-1}). (b) Voltamogramas cíclicos da OxiBeet e pBeet em $\text{KCl } 0,1\text{ mol L}^{-1}$ e controle negativo (linha pontilhada, $0,1\text{ mol L}^{-1}\text{ KCl}_{(\text{aq})}$; eletrodo de carbono vítreo, $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (KCl sat.), velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} , $[\text{betalaína}] = 88\ \mu\text{mol L}^{-1}$.

As entalpias de elétron (e^-), próton (H^+) e átomo de hidrogênio (H^\bullet) foram calculadas no grupo em nível $\text{SMD}(\text{H}_2\text{O})/\text{M06-2X}/6-311++\text{G}(\text{d,p})$ da teoria quântica a fim de determinar a via preferida para a oxidação da OxiBeet.^[105–107] A energia de dissociação homolítica de ligação (BDE) da ligação NO-H da OxiBeet é pelo menos 70 kJ mol^{-1} menor do que a energia requerida para as vias de transferência sequencial próton-elétron (SPLET) ou elétron-próton (ET-PT), como mostrado na Figura 13. Portanto, a ocorrência da transferência concertada de elétron e próton [chamada genericamente de PCET concertado e que engloba transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e transferência concertada de próton e elétron (CPET)] é favorecida termodinamicamente em relação aos processos sequenciais. Adicionalmente, a mudança de -65 kJ mol^{-1} na entalpia da reação isodésmica entre o radical fenoxila e a OxiBeet é muito menor do que os valores reportados para as reações entre o mesmo radical e pBeet (-11 kJ mol^{-1})^[19] ou o seu análogo fenólico ($p\text{-OH-pBeet}$, -32 kJ mol^{-1})^[28]. Esses resultados estão de acordo com os dados eletroquímicos e teóricos e realçam a facilidade com que OxiBeet pode ser oxidada.

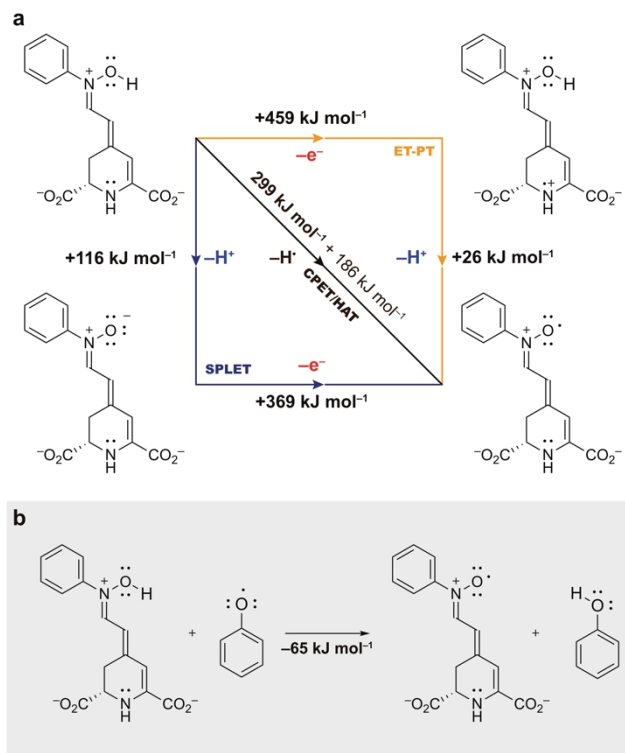


Figura 13. Estudo do mecanismo de oxidação da OxiBeet em um elétron. (a) Diagrama de More O'Ferrall-Jencks para a ionização e oxidação de $1e^-$ da OxiBeet. Os compostos estão apresentados como dicarboxilatos, pois é a forma majoritária esperada em solução aquosa em $\text{pH} > 4$ ^[14]. As energias são referentes as mudanças de entalpia entre os estados, um valor de 186 kJ mol^{-1} na via concertada é necessário para a oxidação de $1e^-$ de H^+ para produzir H^+ e e^- . (b) Reação isodésmica entre o radical fenóxido e OxiBeet para produzir fenol e OxiBeet*⁺.

1-2.5. Formação de radical estabilizado

Uma das características interessantes da OxiBeet é a presença do grupo funcional nitrona. Essa classe de compostos costuma formar radicais nitroxila estáveis, que podem ser detectados por espectroscopia de ressonância paramagnética^[78]. Os experimentos de EPR foram realizados em um espectrômetro Bruker EMX de banda X em colaboração com a Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira e o Dr. Rodrigo Boni Fazzi no IQ-USP.

Uma solução de OxiBeet em tampão fosfato $\text{pH} 7,4$ foi saturada com oxigênio molecular por 1 min a temperatura ambiente para promover a sua auto oxidação. O espectro de EPR do produto mostra um padrão de 14 linhas, indicando um radical NO deslocalizado com as seguintes constantes de acoplamento hiperfino (hfcc, em Gauss): $a_\alpha^{\text{N}} = 11,9$, $a_\beta^{\text{H}} = 6,3$, $a_\gamma^{\text{H}} = 3,3$ e $a_\gamma^{2\text{H}} = 2,9$ (Figura 14a). O resultado é compatível com o cátion radical deslocalizado no nitróxido e no sistema 1,7-diaza-heptametnil da OxiBeet, como determinado pela simulação do EPR. Não foi observado sinal de EPR nos experimentos controle usando pBeet (Figura 14a).

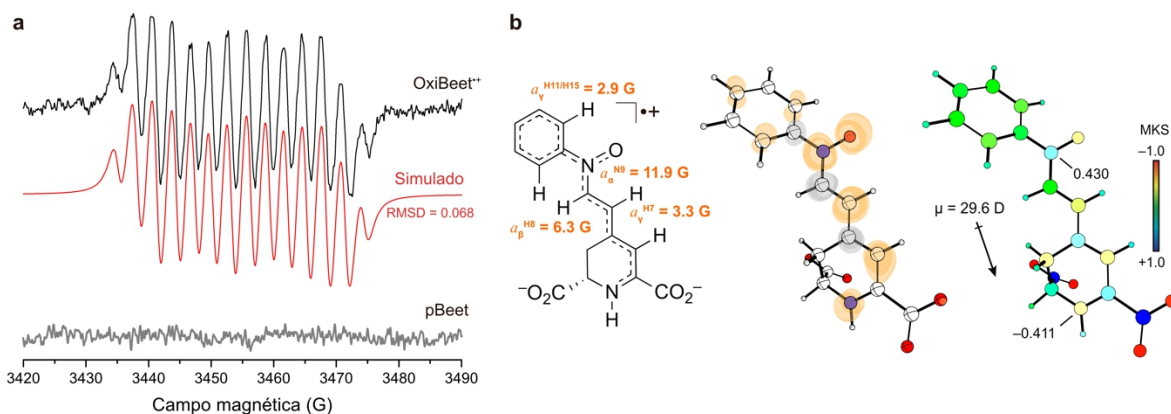


Figura 14. Caracterização do radical da OxiBeet por EPR. (a) Espectro hiperfino de EPR observado (preto) e simulado (vermelho) da OxiBeet^{+•} em tampão fosfato, pH 7,4 a 25 °C. A ausência de resposta para pBeet é apresentada para comparação. A cor da solução manteve-se inalterada durante o experimento. (b) Distribuição de densidade de spin e cargas parciais dos átomos de nitrogênio da OxiBeet^{+•}, vermelho e azul indicam as densidades de spin positivas e negativas, respectivamente. Os valores de hfcc para OxiBeet^{+•} calculados pela simulação são apresentados em laranja.

Para completar a caracterização do cátion radical da OxiBeet, a cinética de formação e desaparecimento do cátion radical foi acompanhada por EPR nas mesmas condições experimentais (Figura 15a). O valor de k_{obs} para a formação do OxiBeet é $(6,5 \pm 1,4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (meia vida, $\tau_{1/2} = 18 \text{ min}$, excesso de O_2 , condições de pseudo-primeira ordem), enquanto k_{obs} para decomposição é muito menor: $(8,8 \pm 2,7) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, tempo de vida, $\tau = 2,5 \text{ h}$, $\tau_{1/2} = 106 \text{ min}$ (Figura 15b). Para comparação, os valores de $\tau_{1/2}$ para os adutos de superóxido com os *spin trap* DMPO, EMPO e CDMPO são 0,9, 9,9, e 27,5 min, respectivamente.^[108]

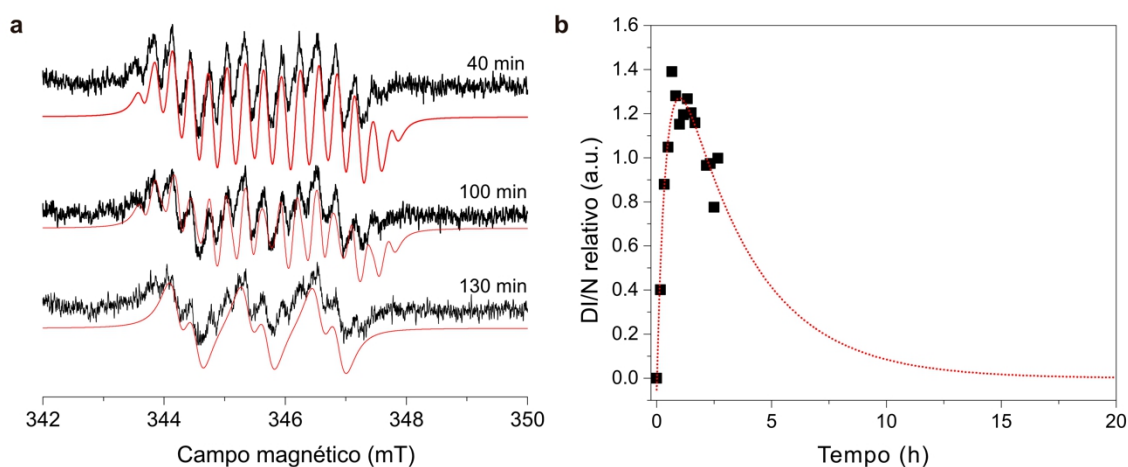


Figura 15. (a) Espectros de EPR selecionados da OxiBeet a 25 °C como uma função do tempo. (b) Cinética de formação e desaparecimento da OxiBeet^{+•} em tampão fosfato pH 7,4 saturado com O_2 a 25 °C. A linha pontilhada vermelha é o ajuste não-linear dos dados com uma função biexponencial.

A densidade de spin positiva da OxiBeet⁺⁺ está localizada nos átomos de N1, C5, C7 e N9 (Figura 14b), o que fornece suporte adicional para a atribuição estrutural. As cargas parciais positivas dos átomos de N1 e N9 aumentam com a oxidação de 1e⁻ da OxiBeet, como esperado considerando argumentos de delocalização de carga. Apesar de estudos da reação entre betanina e radicais terem sido realizados usando espectroscopia de EPR^[109], a OxiBeet é a primeira betalaína que demonstra que o sistema 1,7-diaza-heptametínio aumenta a estabilidade dos radicais nítróxido, o que mostra a sua contribuição para as suas propriedades antioxidantes de betalaínas.^[19,28]

1-3. Conclusões

O repertório de nitronas multifuncionais foi expandido com a síntese de uma betalaína-nitrona prototípica baseada no esqueleto *N*-óxido 1,7-diaza-heptametínio. A OxiBeet é baseada em um material de partida quiral obtido de fontes renováveis e que pode ser convenientemente sintetizado e purificado em água. Este produto pseudo-natural é um potente antioxidante que é oxidado via PCET concertada e é estável em relação à hidrólise em condições aquosas neutras e alcalinas, características que lhe conferem uma clara vantagem sobre as betalaínas naturais. A formação do cátion radical estabilizado por ressonância da OxiBeet via autooxidação permite o desenvolvimento de antioxidantes que podem inibir as alterações induzidas pelo oxigênio em produtos industriais e demonstra a importância do sistema 1,7-diaza-heptametínio para as propriedades antioxidantes das betalaínas em geral. Esses achados indicam que a OxiBeet e seus análogos betalaína-nitronas podem ser potencialmente usados como antioxidantes biocompatíveis, mediadores redox e captadores de spin, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapêuticas para doenças associadas ao estresse oxidativo.

1-4. Parte experimental

1-4.1. Soluções

Solução de ABTS 7 mmol L⁻¹: ABTS (192 mg) foi adicionado a um balão volumétrico e o volume foi completado para 50 mL com água. A solução foi mantida refrigerada (8 °C) e usada por até um mês.

Solução de persulfato de potássio 2,3 mmol L⁻¹: K₂O₈S₂ (6,3 mg) foi adicionado a um balão volumétrico e o volume foi completado para 10 mL com água.

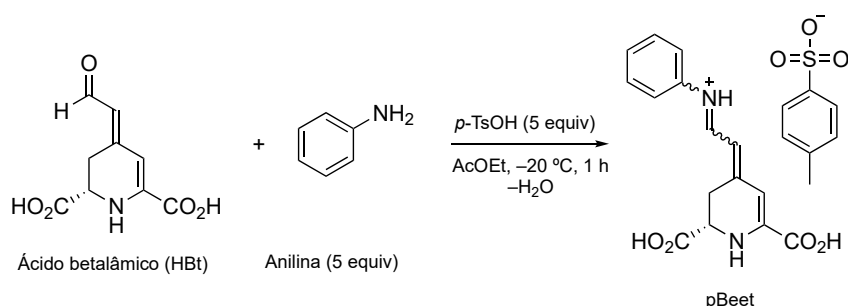
Solução de ABTS^{•+}: uma alíquota da solução estoque de K₂O₈S₂ (2,3 mmol L⁻¹, 88 µL, 1/3 equiv) foi adicionada à 5 mL de uma solução de ABTS (7 mmol L⁻¹). A solução resultante foi mantida em repouso no escuro a temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A concentração de ABTS^{•+} foi determinada espectrofotometricamente em 734 nm ($\epsilon^{734 \text{ nm}} = 1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[101]

Solução de Trolox 0,1 mmol L⁻¹: Trolox (1,3 mg) foi adicionado a um balão volumétrico e o volume foi completado a 50 mL com etanol absoluto.

Solução tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 7,4): NaH₂PO₄ (11,9 mmol, 1,4 g) e de Na₂HPO₄ (0,6 mmol, 90 mg) foram adicionados a um balão volumétrico e o volume foi completado com 250 mL de água.

Solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹: KCl (25 mmol, 1,9 g) foi adicionado em um balão volumétrico e o volume foi completado a 250 mL com água.

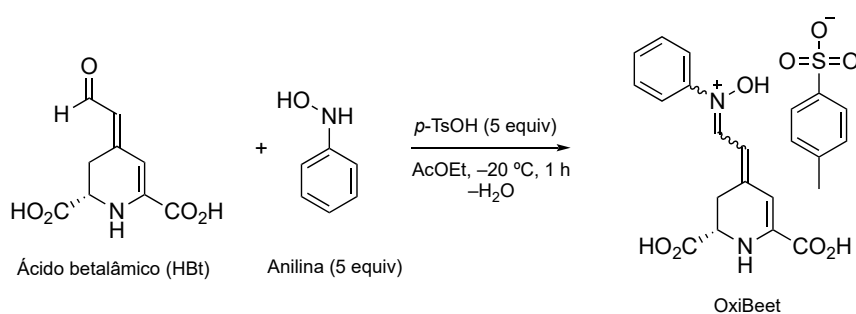
1-4.2. Semissíntese de pBeet



Em um frasco âmbar, ácido *p*-toluenosulfônico (0,12 mmol, 21 mg, 5 equiv.) e anilina (0,12 mmol, 11 µL, 5 equiv.) foram adicionados a 25 mL de uma solução de ácido betalâmico em acetato de etila (1 mmol L⁻¹). A reação foi mantida no freezer (-20 °C) por, pelo menos, 1 hora. A suspensão de pBeet em acetato de etila foi centrifugada (10 min, 3000 ×g, 5 °C) e o precipitado foi coletado e dissolvido em água. pBeet foi purificada por cromatografia de

exclusão em gel de Sephadex LH-20 e água em coluna flash (1,5 × 20 cm, 20 psi). As frações laranja contendo pBeet foram coletadas, reunidas, liofilizadas (−80 °C, 0,08 mbar) e armazenadas no freezer até o uso.

1-4.3. Semissíntese de OxiBeet



Em um frasco âmbar, ácido *p*-toluenosulfônico (0,12 mmol, 21 mg, 5 equiv.) e *N*-fenilhidroxilamina (0,12 mmol, 14 mg, 5 equiv.) foram adicionados a 25 mL de uma solução de ácido betalâmico em acetato de etila (1 mmol L⁻¹). A reação foi mantida no freezer (−20 °C) por pelo menos 1 h. A suspensão de OxiBeet em acetato de etila foi evaporada a pressão reduzida (65 mmHg, 25 °C). O sólido foi dissolvido em água e centrifugado (5 min, 7500 ×g, 25 °C). O sobrenadante foi liofilizado (−80 °C, 0,08 mbar) até redução do volume e purificada por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20 e água em coluna flash (1,5 × 20 cm, 20 psi). As frações laranja contendo OxiBeet foram coletadas, reunidas, liofilizadas (−80 °C, 0,08 mbar) e armazenadas no freezer como um sólido laranja. Rendimento: 50%. OxiBeet também foi preparada em água com o mesmo rendimento final a partir de solução aquosa de HBt.

1-4.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN da OxiBeet foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 800 (18,8 T) operando em 800 MHz (¹H) e 200 MHz (¹³C), usando uma sonda de ressonância criogênica TCI de 5 mm a 288 K. O programa de pulso *zgpr* (pré-saturação) foi utilizado para suprimir o sinal residual da água. O espectro de NMR de ¹³C de OxiBeet foi adquirido usando uma sequência de pulsos *zgpgspzr.vl.cga*. Os experimentos de ¹H, ¹³C-HSQC foram adquiridos usando um programa de pulsos *hsqcetgpsi2*. Os experimentos de ¹H, ¹³C-HMBC foram adquiridos usando um programa de pulsos *hmbcgp1ndqf*. As amostras foram preparadas em D₂O imediatamente antes da aquisição dos espectros a uma concentração de 0,3 mg mL⁻¹. Os espectros de RMN de ¹H de pBeet e OxiBeet nos pDs 2, 5 e 9 foram adquiridos em

espectrômetro Bruker Avance III 500 MHz com sonda TXI de 5 mm a 303 K. O programa de pulso *zgpr* (pré-saturação) foi utilizado para suprimir o sinal da água. O espectro de ^1H , ^1H COSY da OxiBeet em pD 9 foi adquirido usando uma sequência de pulsos *cosyprqf*. O espectro de ^1H , ^1H NOESY da OxiBeet em pD 9 foi adquirido usando uma sequência de pulsos *noesyegpph*. As amostras foram preparadas em D₂O imediatamente antes da aquisição dos espectros a uma concentração de 0,3 mg mL⁻¹. O pD foi ajustado com DCl ou NaOD. Todos os deslocamentos químicos foram reportados como δ (ppm) referentes ao propionato de trimetilsilil (TSP) e os espectros foram processados usando o software MestReNova (v. 11.0.4, 2017, Mestrelab Research).

1-4.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram obtidos a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) usando um espectrômetro Bruker EMX de banda X equipado com uma cavidade padrão e operado a aproximadamente 9,7 GHz com uma frequência de modulação de 100 kHz. As configurações do espectrômetro foram: potência de micro-ondas 20 mW, amplitude de modulação de 0,5 G, constante de tempo = 20,48 ms, 1024 pontos, e janela de varredura de 100 G. O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH; fator $g = 2,0036$) foi usado para calibrar o campo magnético. Soluções de pBeet e OxiBeet (1 mmol L⁻¹) foram preparadas imediatamente antes do uso em tampão fosfato equilibrado com ar (50 mmol L⁻¹, pH 7,4) e mantidos a temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas usando 200 μL de solução em uma cela plana Suprasil (Wilmad). As simulações do espectro de EPR foram realizadas usando o programa *Easyspin* que roda na plataforma do Matlab.^[110] A simulação foi ajustada para coincidir com o espectro experimental usando o método simplex Nelder-Mead. Os seguintes parâmetros foram obtidos na simulação: fator $g = 2,0059$; $a_{\alpha}^{\text{N}} = 33,6$ MHz, $a_{\beta}^{\text{H}} = 17,6$ MHz, $a_{\gamma}^{\text{H}} = 9,2$ MHz and $a_{\gamma}^{2\times\text{H}} = 8,2$ MHz; largura de linha para alargamento isotrópico e largura à meia altura (FWHM) = 0,01% *Gaussiana* e 0,29% *Lorentziana*.

1-4.6. Determinação do coeficiente de absorção molar

O coeficiente de absorção molar (ϵ) da OxiBeet foi calculado a partir da conversão total de ácido betalâmico (HBt, $\epsilon^{424 \text{ nm}} = 27000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[92] Foram adicionados *N*-fenil-hidroxilamina (10 equiv.) e ácido *p*-toluenossulfônico (100 equiv.) a uma cubeta de quartzo de caminho óptico 10 mm contendo uma solução de HBt em água de concentração $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e a formação de OxiBeet foi monitorada usando um espectrofotômetro

Varian Cary 50 Bio a 25 °C. A reação foi acompanhada por HPLC para determinação do final da reação. Após o consumo total do HBt, o valor do ϵ em 500 nm foi determinado correlacionando a concentração inicial de HBt com a concentração final de OxiBeet, de acordo com a Eq. 1, derivada da Lei de Lambert-Beer.

$$\epsilon_{OxiBeet}^{500\text{ nm}} = \frac{Abs_{\infty}^{OxiBeet}}{Abs_{inicial}^{HBt}} \epsilon_{HBt}^{424\text{ nm}} \quad \text{Eq. 1}$$

1-4.7. Determinação de valores de pK_a

Alíquotas de 100 μL de uma solução de pBeet (90 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ou OxiBeet (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionadas a 900 μL de tampão Britton-Robinson com pH desejado em cubetas de quartzo de 1,5 mL e caminho ótico 10 mm e os espectros de absorção e emissão foram registrados imediatamente. As configurações do espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian utilizadas na aquisição dos espectros de emissão da pBeet foram: $\lambda^{\text{EX}} = 500$ nm, intervalo de $\lambda^{\text{EM}} = 525\text{-}800$ nm; excitação: $\lambda^{\text{EM}} = 558$ nm, intervalo de $\lambda^{\text{EX}} = 300\text{-}525$ nm, tensão = 600 V. OxiBeet foram: $\lambda^{\text{EX}} = 510$ nm, intervalo de $\lambda^{\text{EM}} = 530\text{-}800$ nm; excitação: $\lambda^{\text{EM}} = 562$ nm, intervalo de $\lambda^{\text{EX}} = 300\text{-}530$ nm, tensão = 600 V.

1-4.8. Cinética da decomposição

A decomposição de OxiBeet foi monitorada pela aquisição do espectro de absorção de UV-Vis a 60 °C. A persistência de pBeet ou OxiBeet em solução (tampão Britton-Robinson, pH 2 a 9) foi monitorada espectrofotometricamente por 10 h com intervalos entre 1 e 5 min. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) para a hidrólise das betalaínas foram calculadas pelo ajuste mono ou biexponencial da mudança de absorção no máximo em função do tempo. Nos pHs em que não foi possível monitorar a decomposição por pelo menos uma meia vida devido ao lento decaimento, o ajuste exponencial foi realizado considerando $y_0 = 0$.

1-4.9. Voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas a 25 °C com um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT101 (Metrohm), utilizando o software NOVA 1.8. As medidas foram realizadas em cela eletroquímica de 10 mL composta por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (diâmetro do disco = 2 mm); contra-eletrodo de fio de platina e eletrodo de referência Ag|AgCl, KCl sat. A velocidade de varredura

foi fixada em 50 mV s^{-1} e o potencial foi varrido de $-1,0 \text{ V}$ a $+1,0 \text{ V}$ em janela aberta, seguido de varredura em janela fechada, entre $-0,2$ a $1,0 \text{ V}$ (pBeet) ou $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$ (OxiBeet), com 8 ciclos de varredura. As soluções aquosas das betalaínas numa concentração fixa de $88 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, também utilizado como solução controle nos ensaios. Antes e após cada medida, foi realizado o polimento do eletrodo de trabalho com alumina ($0,05 \mu\text{m}$) depositada em um pedaço de feltro umedecido (60 ciclos de movimentos em forma de "8"), seguido por enxágue com água sob radiação ultrassônica por 1 min.

1-4.10. Determinação da capacidade antirradicalar

A capacidade antirradicalar foi determinada usando o método TEAC/ABTS^{•+}. Uma solução de ABTS^{•+}/ABTS foi preparada a partir da solução estoque do cátion radical, preparada 16 h antes, em tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 7,4) com absorvância 0,7 em 734 nm ($47 \mu\text{mol L}^{-1}$). A absorção da solução de ABTS^{•+} foi acompanhada por 6 min após a adição de uma alíquota de antirradical. O efeito do antirradical em reduzir o ABTS^{•+} foi medido pela diferença na absorção em 734 nm. Foram realizadas medidas em concentrações de antirradical entre 0,25 e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. O coeficiente angular α da correlação linear entre a mudança de absorção ΔAbs e a concentração de antioxidante foi medido. A capacidade antirradicalar em equivalentes de Trolox (TEAC) foi calculada como a razão entre o valor de α para a amostra e para o padrão Trolox. ($\alpha_{\text{amostra}}/\alpha_{\text{Trolox}}$).

Capítulo 2

Complexos betalaína-CB[7]: estabilização intermolecular

2-1. Introdução

A encapsulação molecular é uma abordagem muito usada para aumentar a estabilidade cinética a compostos lábeis. Agregados supramoleculares na forma de complexos hospedeiro-hóspede, termo vindo do inglês *host-guest* e que tem sido traduzido também como hospedeiro-convidado ou anfitrião-convidado, são sistemas dinâmicos cujas propriedades dependem de interações intermoleculares íntimas.^[111] Complexos de inclusão betalaína@ciclodextrina (CD), onde @ significa incluso, foram utilizados para estabilizar betalaínas naturais como a betanina.^[43,112,113] As ciclodextrinas mais comuns, α -, β -, e γ -CD, são oligossacarídeos cíclicos biocompatíveis e de custo baixo em escala industrial.^[111] Contudo, sua solubilidade em água é baixa dada a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares que impedem a interação com a água e sua interação com o hóspede tende a envolver

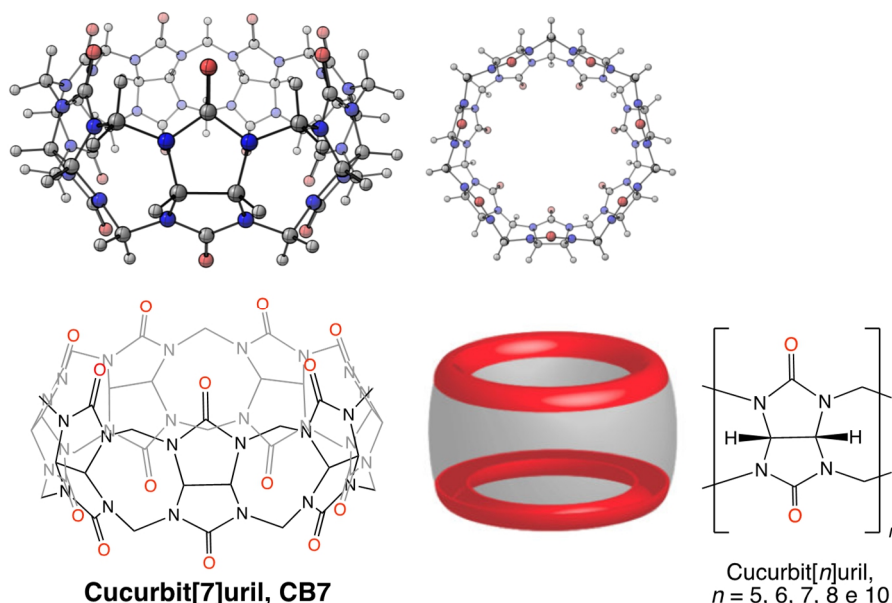
Nesse capítulo, são apresentados os resultados obtidos tentando-se descobrir se complexos de inclusão cucurbit[7]urila-betaxantina (CB7-Bx) são estáveis, se a estabilidade de betalaínas frente à hidrólise aumenta nesses complexos e se a restrição conformacional imposta pela interação supramolecular resulta em aumento do rendimento quântico de fluorescência de betalaínas. Foram usadas como compostos-modelo a betaxantina da anilina, pBeet, e a betaxantina da *p*-fenilenodiamina, *p*-NH₂-pBeet.^[91]

2-1.1. Cucurbiturilas como hospedeiros

Cucurbit[*n*]urilas (CB[*n*]) são compostos macrocíclicos formados pela condensação entre glicoluril (tetra-hidroimidazo[4,5-*d*]imidazol-2,5(1*H*,3*H*)-diona) e formaldeído em meio ácido.

A quantidade de unidades monoméricas de glicoluril é representada pelo parâmetro n no nome da cucurbiturila e permite modular o diâmetro da cavidade da CB[n] e, assim, a dimensão dos hóspedes que o macrociclo pode acomodar. Quando Mock e coautores sintetizaram estes compostos pela primeira vez em 1981, eles consideraram que seu formato lembrava uma abóbora (*Cucurbita* spp.) e com o frasco do alambique alquímico para destilação chamado de *cucurbit* (Esquema 10).^[114–116]

A cucurbiturila utilizada nessa Tese é a cucurbit[7]urila (CB[7] ou CB7), que possui sete unidades de glicoluril e, embora tenha tamanho similar ao da β -ciclodextrina (diâmetro interno = 0,73 nm e 0,78 nm, respectivamente), é muito mais solúvel em água (20-30 mmol L⁻¹) e forma complexos mais estáveis (constante de afinidade de até 10¹⁵ L mol⁻¹).^[111,117] Os portais da CB7 têm diâmetro 0,2 nm menor que a cavidade, criando uma barreira estérica para os hóspedes.^[118] O volume expandido da CB7 é de 279 Å³ (0,279 nm³)^[119] e o da cavidade interna é de 242 Å³ (0,242 nm³)^[120], o que permite que acomode anéis aromáticos,^[121] ou de 7 a 8 moléculas de H₂O dentro da sua cavidade.^[120] O deslocamento das moléculas de água da cavidade foi considerado um constituinte importante da força motriz para a formação de complexos de inclusão com CBs.^[120,122]



Esquema 10. Representações estruturais de cucurbiturilas.

A estrutura cíclica das cucurbiturilas resulta em uma cavidade com interior hidrofóbico de baixa polarizabilidade, devido à ausência de grupos funcionais ou pares de elétrons nesse ambiente químico, e dois portais formados pelas carbonilas das porções ureia.^[121] As superfícies de densidade eletrônica mapeadas com potencial eletrostático das CBs mostram

que os portais apresentam densidade eletrônica negativa devido aos oxigênios carbonílicos, enquanto o exterior da CB possui densidade de carga positiva pela presença de átomos de hidrogênio. Os portais participam de interações do tipo íon-dipolo e dipolo-dipolo, incluindo as respectivas ligações de hidrogênio, o que explica a preferência de CBs por espécies catiônicas.^[118,123–126] As interações entre o hóspede e a cavidade da CB ocorrem principalmente via interações hidrofóbicas. Assim, há uma preferência para a inclusão de porções hidrofóbicas ou neutras de compostos que tenham grupos polares que interajam com os portais.^[117,118] A solubilidade da cucurbit[7]urila em água aumenta na presença de ácidos ou íons metálicos alcalinos,^[111,118] embora a interação com cátions metálicos possa interferir na complexação com compostos orgânicos.^[127]

Espécies químicas incluídas em CBs estão sujeitas a mudanças nos seus espectros de absorção, fluorescência, dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN), o que permite caracterizar a interação hóspede-hospedeiro.^[118,128] Frequentemente, a inclusão de corantes fluorescentes solúveis em água em CBs aumenta a eficiência de fluorescência visto que a cavidade das CBs é muito menos polar do que o meio aquoso, há restrição vibracional e conformacional do hospedeiro, o que favorece o decaimento do estado excitado por via radiativa e o hospedeiro protege os corantes da interação com sequestradores de fluorescência.^[121,129] CBs também conferem estabilização cinética para compostos sensíveis a interação com água ou outras espécies reativas em meio aquoso. Em particular, iminas podem ser protegidas da hidrólise ao formarem complexos com CB7, que forma interações do tipo íon-dipolo entre os oxigênios do portal carbonila e o nitrogênio da imina positivamente carregado.^[130,131]

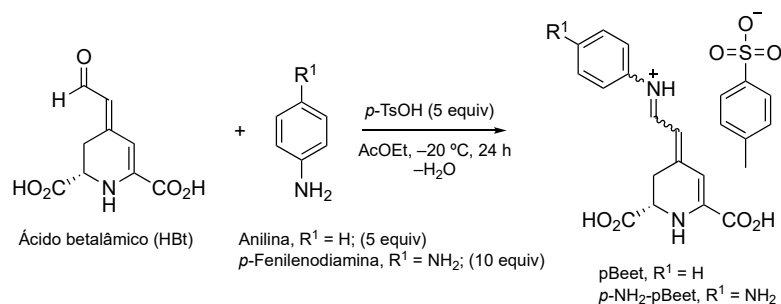
Cucurbit[7]urila possui baixa toxicidade e têm sido utilizadas em aplicações biológicas, medicinais e farmacêuticas para aumentar a solubilidade de espécies farmacologicamente ativas hidrofóbicas em água, bem como a sua estabilidade e biodisponibilidade.^[132] Complexos de CB7 também tem aplicação destacada como sistemas para entrega controlada de medicamentos.^[124]

Em conjunto, estes fatos e o potencial aplicado de complexos de inclusão, tornam a CB7 uma alternativa para estabilizar betalaínas, produtos naturais coloridos e redox ativos que são positivamente carregadas em meio ácido, fracamente fluorescentes e sensíveis à hidrólise.

2-2. Resultados e discussão

A tendência de cucurbiturilas em complexar cátions nos levou a considerar o estudo da inclusão da betaxantina derivada da *p*-fenilenodiamina, que pode ter carga formal 2+ em meio ácido. Para determinar o papel do grupo amino sobre a inclusão, pBeet foi usada como composto de referência.

Como descrito no Capítulo 1, pBeet é o produto da reação entre ácido betalâmico (HBt) e anilina em acetato de etila acidificado (Esquema 11). Após 24 h de reação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o *p*-toluenossulfonato de pBeet precipita como um sólido vermelho. A *p*-NH₂-pBeet (lida *para*-aminopBeet) foi semissintetizada, seguindo o mesmo protocolo, a partir de excesso de *p*-fenilenodiamina. A presença de dois grupos amino livres na *p*-fenilenodiamina resulta na formação de duas betalaínas: a *p*-NH₂-pBeet, sólido roxo formado pelo acoplamento da amina com uma molécula de ácido betalâmico, e a WireBeet, derivada de duas moléculas de ácido betalâmico. A variação da proporção estequiométrica entre *p*-fenilenodiamina e HBt permite controlar qual dos produtos será formado majoritariamente. Esse capítulo da Tese trata da *p*-NH₂-pBeet, que foi preparada empregando-se 10 equivalentes de *p*-fenilenodiamina. A WireBeet, sintetizada com excesso de HBt, é o tema do próximo capítulo.



Esquema 11. Reação entre ácido betalâmico e anilina (R¹ = H) ou *p*-fenilenodiamina (R¹ = NH₂) em acetato de etila na presença de ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TsOH), formando pBeet ou *p*-NH₂-pBeet. Rendimento: 19 e 21%, respectivamente

pBeet e *p*-NH₂-pBeet foram pré-purificadas por HPLC semipreparativo em condições de fase reversa utilizando sílica C18 como fase estacionária. Para pBeet, a corrida cromatográfica se deu em um sistema isocrático de 20%(v/v) MeCN/H₂O como fase móvel e para a *p*-NH₂-pBeet a quantidade de acetonitrila foi diminuída para 5%(v/v). As frações contendo cada uma das betalaínas foram reunidas e purificadas por cromatografia de exclusão por tamanho em gel de Sephadex LH-20/água. As concentrações das soluções estoque de pBeet e *p*-NH₂-pBeet foram determinadas espectrofotometricamente com seus respectivos coeficientes

de absorção molar no máximo de absorção: $\epsilon^{521\text{nm}} = 57000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon^{507\text{nm}} = 59000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinados pelo método do ponto final em trabalhos anteriores do grupo.^[91] Observou-se que os valores de ϵ sofrem pouca influência do pH do meio, mas podem ser afetados pela presença de CB7 (Anexo 14). Embora esses sejam detalhes experimentais, essas informações são importantes na interpretação dos dados de complexação e são apresentadas aqui para conveniência.

A qualidade das cucurbiturilas (CBs) varia muito com o fornecedor comercial e com os métodos de síntese e purificação. CBs são consideravelmente higroscópicas e podem conter impurezas como HCl e Na^+ , que podem ou não influenciar nos estudos de complexação.^[133] Parte da CB7 usada nesse trabalho foi preparada no grupo da Profa. Cornelia Bohne na Universidade de Victoria e a concentração real da amostra foi determinada por titulação colorimétrica com o cátion cobaltoceno, que forma um complexo de inclusão altamente estável com CB7 ($\text{Cob}^+@CB7$, $K_{1:1} = 5,7 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$).^[134,135] As concentrações das soluções de CB7 em HCl aquoso 1 mmol L^{-1} foram determinadas através da titulação espectrofotométrica de cobaltoceno usando CB7 como titulante. A formação do complexo de inclusão 1:1 foi monitorada em 261 nm e permitiu determinar a concentração de CB7 a partir do ponto de equivalência (Anexo 15). Quando CB7 comercial foi usada, ela foi titulada da mesma forma e o seu espectro de RMN de ^1H foi comparado com aquele da amostra vinda do Canadá (Anexo 16).

2-2.1. Complexação entre betaxantinas e CB7

Para determinar se as betalaínas formam complexos com CB7 foi usado o método das variações contínuas, conhecido como método de Job. O gráfico de Job, em inglês *Job Plot*, apresenta a variação da emissão de fluorescência ($\Delta\text{Integral}$) com a fração molar de um dos componentes do complexo. Os resultados obtidos sugerem a complexação entre CB7 e pBeet ou *p*- NH_2 -pBeet (Anexo 17). Entretanto, observa-se um comportamento diferente de um sistema com estequiometria 1:1 bem definida. Ao invés da parábola invertida com máximo na fração molar 0,5 esperada, foram obtidas parábolas deslocadas e dispersões de pontos que sugerem que há múltiplos complexos em solução. Neste caso, o uso do método de Job para estudo do sistema é desaconselhado.^[136]

Para superar esta dificuldade, a estequiometria dos complexos de inclusão de cada uma das betaxantinas com CB7 e as constantes de equilíbrio de complexação foram determinadas por titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica com a concentração da betalaína

(*p*-NH₂-pBeet ou pBeet) constante enquanto a quantidade de CB7 foi variada a 25 °C. Esse protocolo, no qual a concentração de hospedeiro é variada, é descrito na literatura^[126,129,135,137] e é mais conveniente para o estudo de betalaínas dada a limitação na quantidade de material disponível.

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram registrados imediatamente após a adição da alíquota da solução estoque de CB7 para evitar qualquer efeito de decomposição das betalaínas. A curva de titulação, chamada *isoterma de ligação*,^[138] foi construída como um gráfico da variação da absorção ou da área sobre o espectro de fluorescência em função da concentração de CB7 adicionada. A adição de CB7 à *p*-NH₂-pBeet em água provoca um deslocamento hipsocrômico e hiperacrômico no máximo de absorção da betalaína devido à sua interação com a cucurbiturila (Figura 16a). Apesar do deslocamento resultante da formação do complexo de inclusão ser evidente, a grande sobreposição entre a banda de absorção da betalaína livre e do complexo dificultam a caracterização das propriedades do complexo por absorção. Por outro lado, a complexação aumenta a intensidade de fluorescência de *p*-NH₂-pBeet em 38 vezes, fenômeno que foi usado para estudo do sistema (Figura 16a). Para a pBeet, a adição de CB7 tem um efeito muito sutil sobre o espectro de absorção de pBeet, embora o máximo de absorção também se desloque para comprimentos de onda mais curtos, há um efeito hipocrômico. A fluorescência da pBeet, por outro lado, é suprimida pela CB7 (Figura 16b). Em ambos os casos, o desvio hipsocrômico sugere concentração de carga com a complexação. O aumento do valor de ϵ no caso da *p*-NH₂-pBeet deve estar relacionado a mudanças de estado de protonação promovidas pela complexação com CB7 porque a banda de absorção da betaxantina em pH 2 também é deslocada para comprimentos de onda mais curtos (Anexo 14).

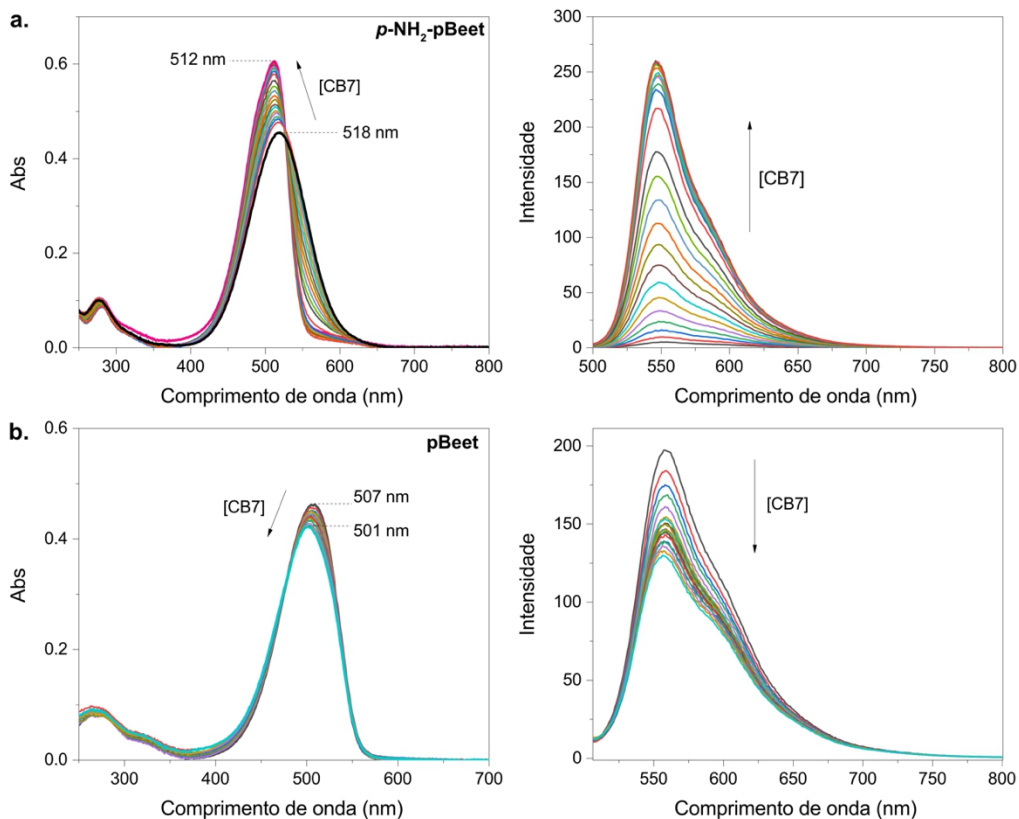
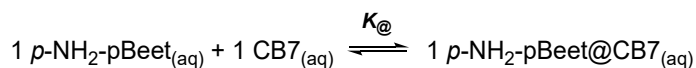


Figura 16 Titulação da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ (a) e $p\text{Beet}$ (b) com cucurbit[7]urila em água acompanhada por espectroscopia de absorção e fluorescência a 25 °C; $[\text{Bx}] = 7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{CB7}] = 1,4 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A área sobre a curva de emissão foi graficada em função da concentração de CB7 (Figura 17). Observa-se que a fluorescência permanece constante a partir de uma proporção de aproximadamente 2:1 CB7:betaxantina, sugerindo que essa seja a forma majoritária presente em solução. Para testar essa hipótese, a isoterma de complexação de CB7 com $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ foi submetida à ajuste não linear empregando-se dois modelos para estequiometria 1:1 e estequiometria 2:1 (hospedeiro-hóspede), descritos pelas Eqs 2 a 04.

Assumindo estequiometria 1:1, temos:



onde,

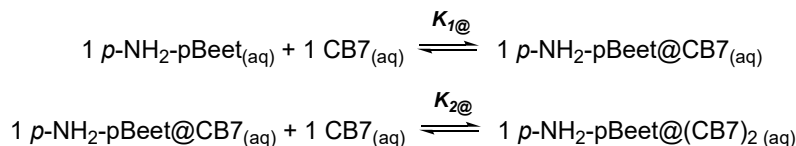
$$K_{\text{@}} = \frac{[\text{Bx@CB7}]}{[\text{Bx}][\text{CB7}]} \quad \text{Eq. 2}$$

Sabendo-se que o sistema se torna fluorescente com a complexação e que o CB7 não sequestra a fluorescência da betaxantina, a fluorescência observada (F_{obs}) corresponde a:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + \left(\frac{F_{\text{max}}}{F_0} - 1 \right) \frac{[\text{CB7}]_0 K_{\text{@}}}{1 + [\text{CB7}]_0 K_{\text{@}}} \quad \text{Eq. 3}$$

onde F_{\max}/F_0 é o aumento máximo da fluorescência quando 100% da Bx está complexada.^[139,140]

Assumindo estequiometria hospedeiro-hóspede (*host-guest*) 2:1, temos:



Assim, obtém-se:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + F_A K_{1@} [\text{CB7}]_0 + F_B K_{1@} K_{2@} ([\text{CB7}]_0)^2}{1 + K_{1@} [\text{CB7}]_0 + K_{1@} K_{2@} ([\text{CB7}]_0)^2} \quad \text{Eq. 4}$$

onde F_A e F_B são as fluorescências relativas da betalaína complexada vs. livre para os complexos 1:1 e 2:1 respectivamente.^[141]

Esse tipo de ajuste não-linear pode ser difícil considerando-se que quatro parâmetros devem ser ajustados simultaneamente e que há muitos mínimos locais possíveis. Assim, utilizou-se um algoritmo criado no grupo do Prof. Eric Anslyn para convergência de ajustes de constantes de associação empregando-se a Eq. 3.^[142] Com essa abordagem foi possível determinar que $K_{1@}$ e $K_{2@}$ para a complexação de *p*-NH₂-pBeet e CB7 são iguais, respectivamente, a $(4,7 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ e $(2,1 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$. Para comparação, é apresentado em azul o ajuste obtido com a Eq. 2 que considera estequiometria 1:1.

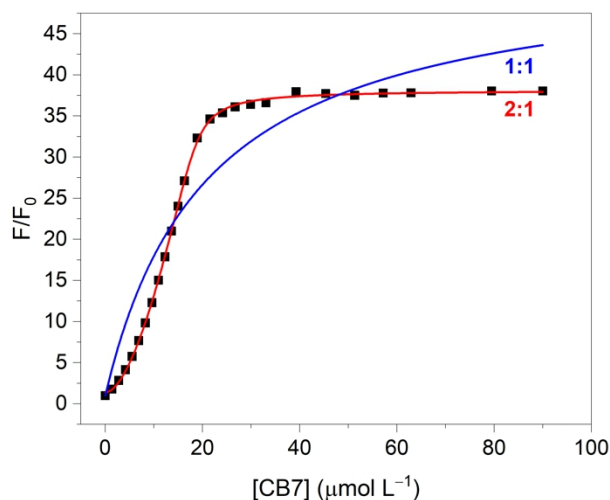


Figura 17. Variação da área sobre a curva de fluorescência de *p*-NH₂-pBeet em função da concentração de cucurbit[7]urila em água a 25 °C. Condições: $[p\text{-NH}_2\text{-pBeet}] = 7,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Ajuste não linear ($N = 26$) com Eq. 3 (1:1) em azul; $K_{@} = 4,5 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, $F_{\max}/F_0 = 53$, $R^2 = 0,9022$, $\text{AIC} = 83,6$. Com a Eq. 4 (2:1) em vermelho; $K_{1@} = (4,7 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, $K_{2@} = (2,1 \pm 0,2) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$; F_A fixo em 1; $F_B = 37,8 \pm 0,2$; $y_0 = 0,4 \pm 0,2$, $R^2 = 0,9997$, $\text{AIC} = -58,9$.

Quando o sequestro da fluorescência da pBeet por CB7 é interpretado como o resultado da formação de um complexo não emissivo no estado fundamental (sequestro estático e não dinâmico) a Eq. 3 pode ser usada para determinar os valores das constantes de associação. Como tanto o modelo para complexos 1:1 quanto 2:1 (hospedeiro-hóspede) se ajustam aos dados de fluorescência, a qualidade dos ajustes deve ser determinada empregando-se métodos estatísticos adequados (e não o valor do coeficiente de determinação). Assim, os ajustes foram submetidos a análise de AIC (*Akaike Information Criteria*), no qual o menor valor indica o modelo com melhor ajuste. O modelo que considera estequiometria 2:1 tem AIC igual a -177 enquanto o modelo para estequiometria 1:1 tem AIC igual a -178 tendo, portanto, o melhor ajuste, mesmo que os valores sejam bastante próximos.

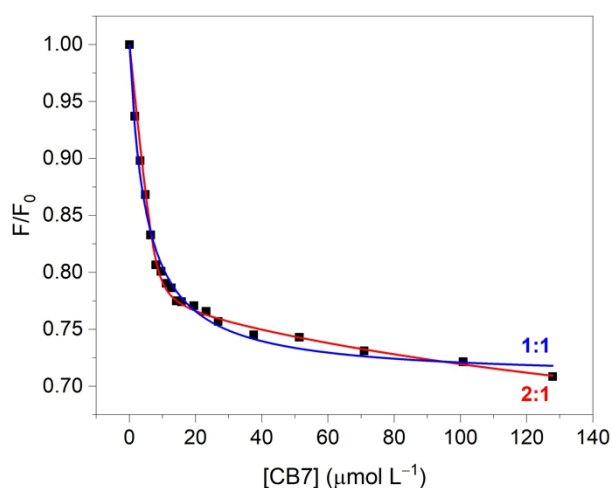


Figura 18. Variação da área sobre a curva de fluorescência de pBeet em função da concentração de cucurbit[7]urila em água a 25 °C. Condições: $[pBeet] = 7,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Ajuste não linear ($N = 19$) com Eq. 3 (1:1) em azul; $K_{@} = (2,0 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1}$, $F_{\text{max}}/F_0 = 0,71 \pm 0,01$, $R^2 = 0,9899$, $AIC = -178,4$. Com a Eq. 4 (2:1) em vermelho; $K_{1@} = (2,9 \pm 1,9) \cdot 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, $K_{2@} = (4,2 \pm 8,5) \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$; $F_A = 0,76 \pm 0,01$; $F_B = 0,59 \pm 0,23$; $y_0 = \text{fixo em } 0$, $R^2 = 0,9925$, $AIC = -177,1$.

2-2.1.1. Espectroscopia de RMN e espectrometria de massas

O complexo de inclusão pBeet@CB7 foi investigado por espectroscopia de RMN de ^1H . Um equivalente de CB7 foi adicionado a uma solução de pBeet em D_2O sem TSP dada a alta concentração de Na^+ no padrão interno, íon que compete com a betalaína pelo CB7 (Figura 19 e Anexo 18). O experimento foi feito nessas condições considerando-se o efeito de um excesso maior que duas vezes sobre a complexidade dos espectros. Por isso, o sinal da H_2O residual em D_2O foi utilizado como referência para comparação dos deslocamentos químicos entre os espectros de pBeet na ausência e na presença de CB7, adquiridos nas mesmas condições experimentais.

A formação do complexo pBeet@CB7 em concentrações equimolares de CB7 e pBeet é evidenciado pelos seguintes resultados:

- a) O H8 da pBeet é desblindado na presença de CB7 ($\Delta\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{complexo}} - \delta_{\text{livre}} = 0,03$ ppm) e muda o perfil do sinal de um singleto largo na ausência de CB7 para um dubleto com constante de acoplamento ${}^3J_{\text{H7/H8}}$ de 11,6 Hz.
- b) Os sinais do H5 e H7 da pBeet se sobrepõem na ausência de CB7, visto que ambos são hidrogênios alílicos com ambiente químico similar em um sistema imina/enamina conjugado. A inclusão na CB7 desblinda o H7 ($\Delta\delta_{\text{obs}} = 0,15$ ppm), resolvendo os sinais (H5 como singleto e o H7 como dubleto com ${}^3J_{\text{H7/H8}}$ de 11,8 Hz, valor similar ao acoplamento entre H7 e H8 determinado para outras betalaínas puras em D₂O).^[28,62,88,91] Esse efeito pode estar relacionado com a protonação da porção imina inserida dentro da CB7, enquanto o anel 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetra-hidropiridínio (que contém o H5) está mais exposto ao meio.
- c) O H2 também é desblindado na presença de CB7 ($\Delta\delta_{\text{obs}} = 0,08$ ppm) e há perda de resolução do tripleto. Esse comportamento também é observado para H3a e H3b, mas o efeito de desblindagem é maior ($\Delta\delta_{\text{obs}} = 0,43$ e 0,27 ppm, respectivamente). Esse resultado pode estar relacionado ao posicionamento desses átomos no portal da CB7.
- d) Os sinais do anel aromático (HAr) passam de um sistema típico de benzeno monossustituído para um multipletto mal resolvido com maior blindagem ($\Delta\delta_{\text{obs}} \sim 0,8$ ppm) de todos os núcleos de hidrogênio. Esse resultado corrobora a hipótese que o anel aromático está inserido na cavidade da CB7.

Em resumo, para pBeet, a complexação resolve os sinais de H5, H7 e H8 e alarga os sinais de H2, H3a/H3b e HAr. Esse resultado sugere que o equilíbrio conformacional do anel 2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetra-hidropiridínio tem quantidades próximas dos conformeros carboxi-axial e carboxi-equatorial, mas que a rotação diedral do sistema 1,7-diaza-heptametínio se torna mais restrita, possivelmente pela inclusão do anel aromático na CB7 e ligação de hidrogênio da imina protonada com a carbonila do portal. A cavidade da CB7 é hidrofóbica e tem maior propensão à acomodar porções menos polares da molécula,^[129] como o anel aromático da pBeet. Os portais de densidade negativa gerados pelos oxigênios carbonílicos da CB7 desblindam os demais hidrogênios da pBeet visto que esses grupos estabelecem ligações de hidrogênio que acabam por diminuir a densidade de carga negativa no hidrogênio por efeito indutivo retirador de elétrons. Este resultado condiz com outros exemplos de complexos de inclusão 1:1 com CB7, como metilviologênio ou cumarina, encontrados na literatura.^[121,143–145]

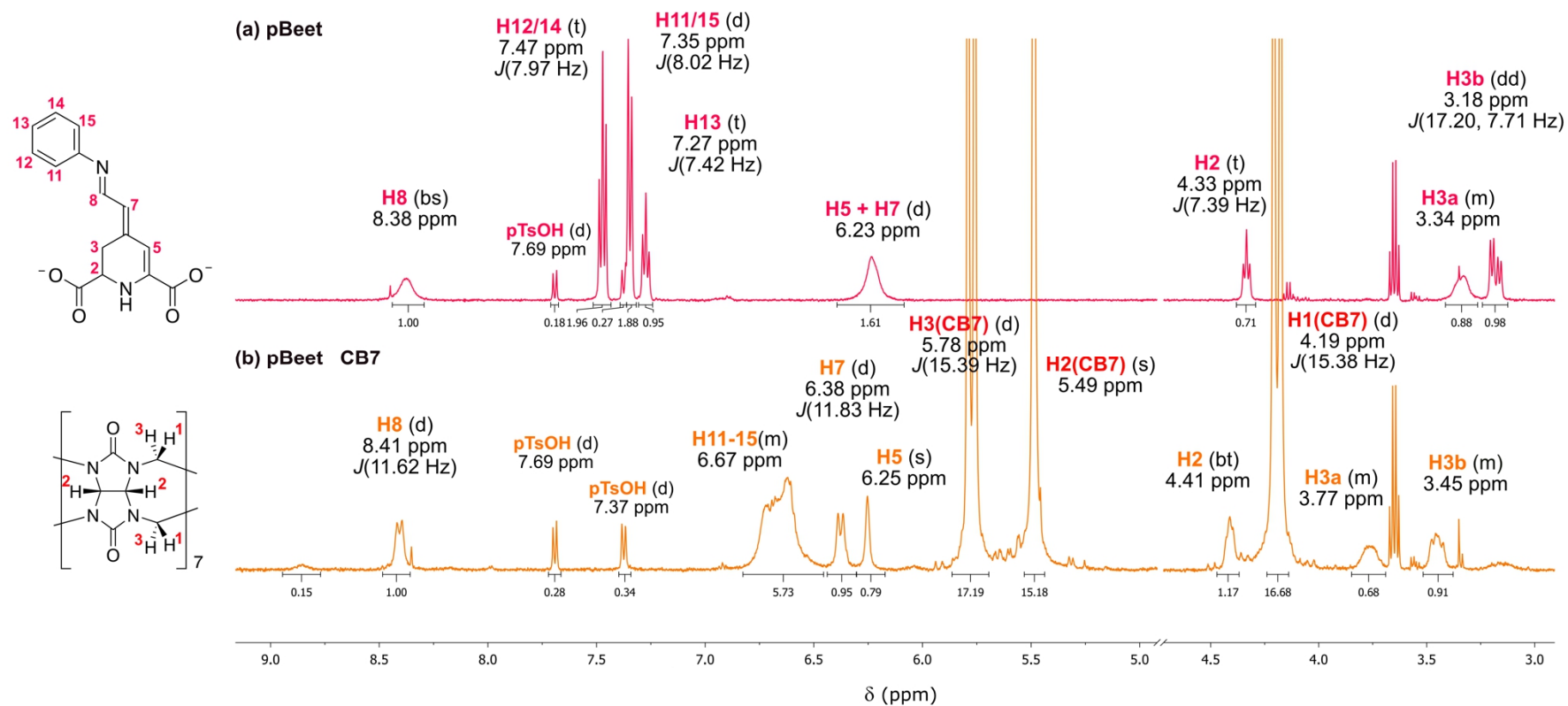


Figura 19. Espectros de ^1H -RMN 500 MHz de (a) pBeet e (b) pBeet na presença de 1 equiv. de cucurbit[7]urila em D_2O a 25°C . O sinal da H_2O foi suprimido com a sequência de pulsos *zgpr*.

O efeito da CB7 sobre o espectro de RMN de ^1H da *p*-NH₂-pBeet é diferente do que se observa para a complexação da pBeet possivelmente por causa da estequiometria diferente. Os sinais da betaxantina se alargam com a adição de CB7, diminuindo a resolução dos multipletos. Esse resultado pode estar relacionado a uma troca rápida entre a betalaína livre e a betalaína complexada com CB7,^[129,145–147] proximidade da equivalência molar entre *p*-NH₂-pBeet e o seu complexo com CB7 e/ou troca dos átomos de H por D, visto que as análises foram feitas em sequência com a mesma amostra.^[129,148] Com o aumento da concentração de CB7, observa-se a blindagem dos núcleos de H aromáticos e coalescência dos sinais como resultado do posicionamento na cavidade hidrofóbica da cucurbiturila.^[121] As integrais dos hidrogênios aromáticos da *p*-NH₂-pBeet em 7,22 ppm e 6,91 ppm diminuem, enquanto as integrais dos sinais em 6,23 ppm e 6,42 ppm nos espectros do complexo aumentam com o aumento da concentração de CB7 em solução (1 e 2 equiv.) (Figura 20). A inclusão da região aromática da betalaína na CB7 resulta na blindagem desses núcleos, de forma análoga ao que se observa para a complexação de *p*-fenilenodiamina com CB7.^[149]

A betalaínas e os seus complexos de inclusão foram preparados com excesso de CB7 (5 equiv) e analisados por HPLC-ESI-QToF-MS em modo positivo. As separações cromatográficas foram realizadas em condições de fase reversa com sílica-C18 e um gradiente de MeCN/H₂O acidificados com 5% v/v de ácido fórmico como fase móvel. Na corrida cromatográfica, o complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7 se dissocia e a CB7 é detectada com tempo de retenção igual a 3,7 min e com um sinal com *m/z* 582,1794, valor compatível com o íon $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ da CB7 complexada com dois íons H⁺, presentes na fase móvel da corrida (*m/z* 582,1790, erro 0,7 ppm). A *p*-NH₂-pBeet foi detectada na sua forma livre, com mesmo tempo de retenção observado na amostra pura (*t_r* = 12,9 min, *m/z* 302,1141, erro 2,0 ppm, $[\text{M} + \text{H}]^+$) (Figura 21a). Esses dados sugerem que a presença de acetonitrila ou ácido podem comprometer a estabilidade do complexo, bem como a interação com a fase estacionária.

Tentou-se detectar o complexo de inclusão *p*-NH₂-pBeet@CB7 através de análise de massas por infusão direta. Foi observado um sinal com *m/z* 732,7303 (erro -2,6 ppm) compatível com o íon $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ resultado da protonação completa do complexo 1:1 *p*-NH₂-pBeet@CB7 (Figura 21d, Esquema 12), mas não o complexo 2:1 (relações *m/z* calculadas para os íon $[\text{M}_{\text{Bx}} + \text{M}_{2\text{CB7}} + 2\text{H}]^+ = 1314,4056$, $[\text{M}_{\text{Bx}} + \text{M}_{2\text{CB7}} + \text{H}]^+ = 2626,8006$ e $[\text{M}_{\text{Bx}} + \text{M}_{\text{CB7}} + 2\text{H}]^+ = 732,7322$). Observou-se o cloridrato de *p*-NH₂-pBeet@CB7 formado com HCl residual da síntese do macrociclo, *m/z* 338,3420.

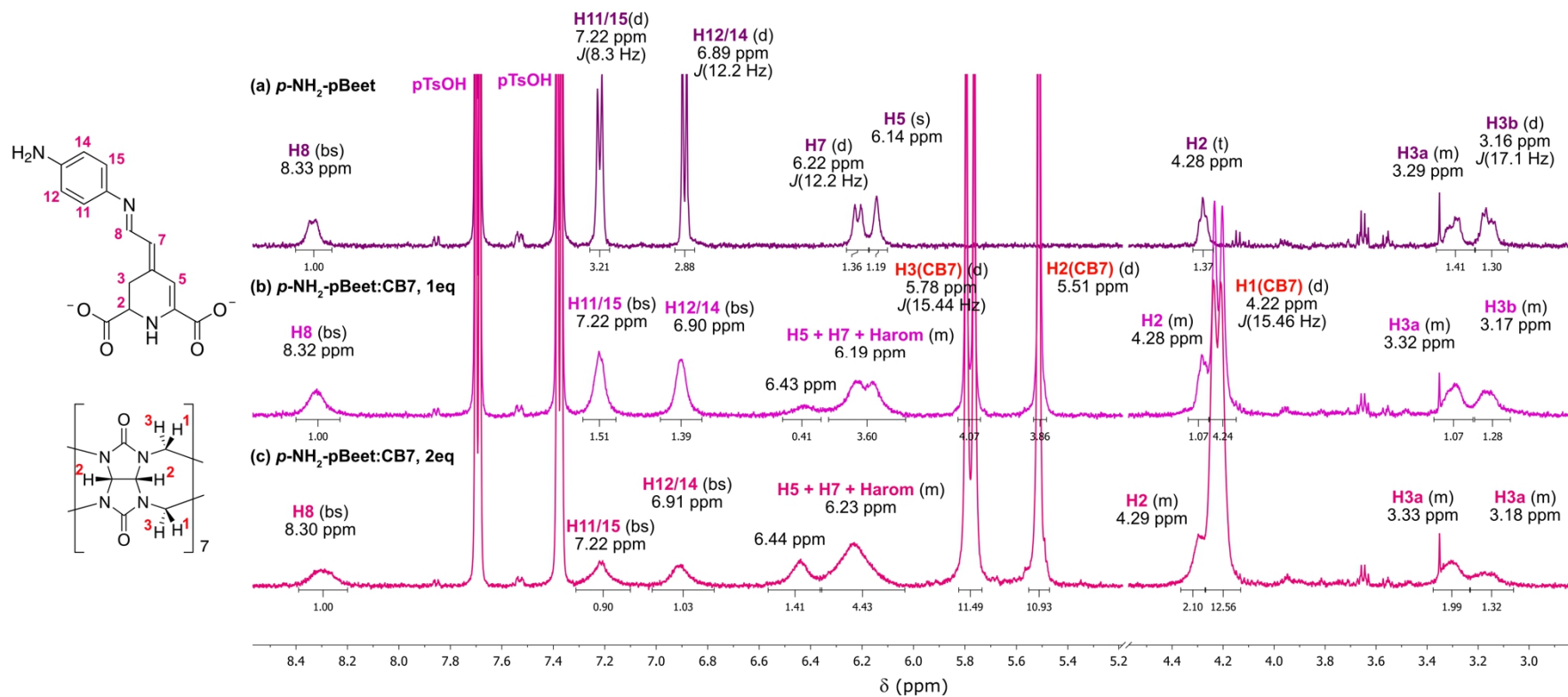


Figura 20. Espectros de ¹H-RMN 500 MHz de (a) *p*-NH₂-*p*Beet; (b) *p*-NH₂-*p*Beet e 1 equiv de cucurbit[7]urila; (c) *p*-NH₂-*p*Beet e 2 equiv de CB7 em D₂O a 25 °C.

Os mesmos experimentos foram realizados utilizando pBeet e CB7, cujo íon $[M_{Bx} + M_{CB7} + H]^+$ tem m/z 1449,4462, mas não foi possível identificar nenhuma relação m/z compatível com o complexo pBeet@CB7. O complexo pBeet@CB7 1:1 tem constante de estabilidade uma ordem de grandeza menor que *p*-NH₂-pBeet@CB7 ($K_{@} = (2,0 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ vs. $K_{1@} = (4,7 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$) e o complexo 1:1 da *p*-NH₂-pBeet@CB7 é mais estável que o complexo 2:1 ($K_{1@} = (4,7 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ vs. $K_{2@} = (2,1 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$). Assim, pode ser que os complexos de interesse sejam dissociados durante a ionização da amostra ou que tenham um tempo de vida mais curto que aquele necessário para atingir o detector. A descrição de todas as espécies identificadas, bem como suas fragmentações MS² é apresentada no Esquema 12.

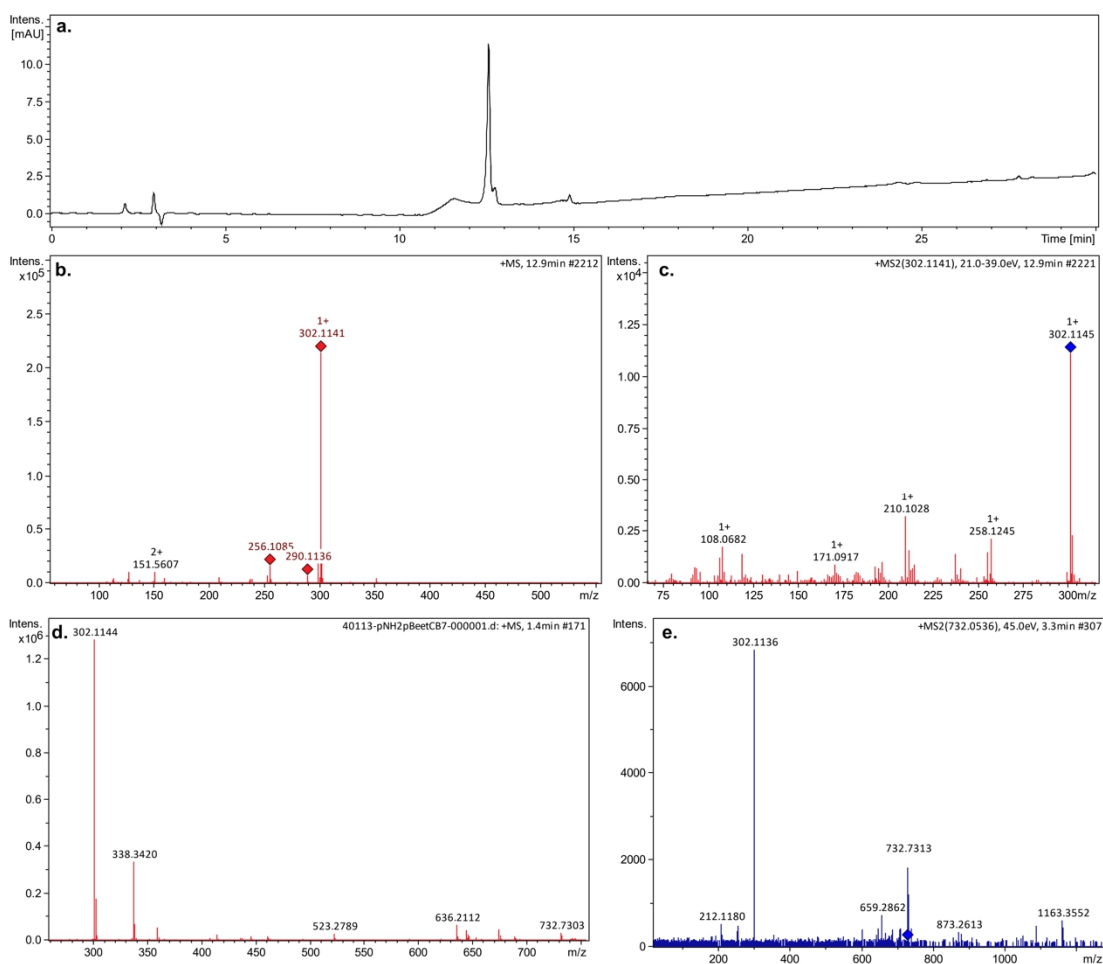
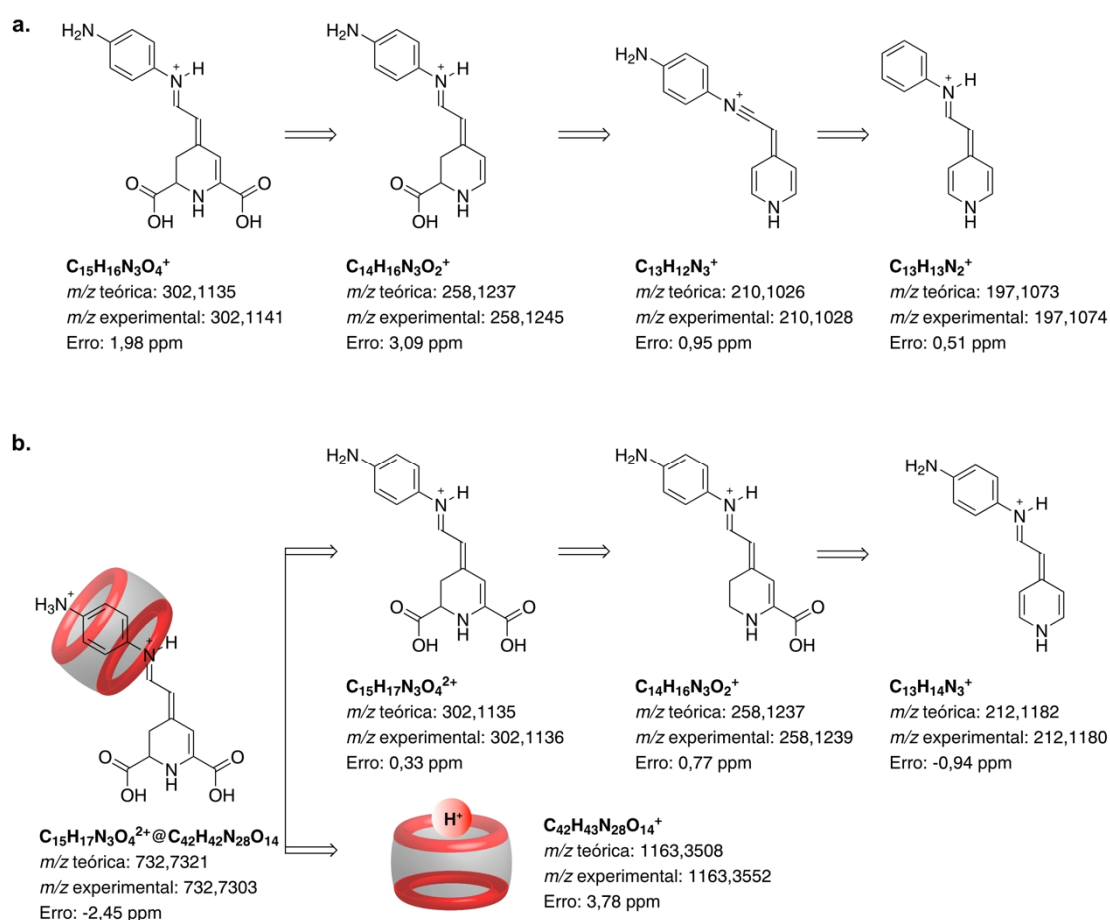


Figura 21. Dados de espectrometria de massas da *p*-NH₂-pBeet. (a) Cromatograma de íons totais da *p*-NH₂-pBeet; (b) Espectro de massas de alta resolução (HRMS) do pico cromatográfico com tempo de retenção igual a 12,9 min, cujo m/z 302,1141 é compatível com massa esperada para a forma protonada da *p*-NH₂-pBeet; (c) Fragmentação MS/MS do pico com m/z 302,1141; (d) Espectro de massas por infusão direta do complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7; (e) Fragmentação MS/MS do pico com m/z 732,7303.



Esquema 12. Dados de espectrometria de massas de alta resolução para *p*-NH₂-pBeet e *p*-NH₂-pBeet@CB7. (a) Estruturas possíveis para os íons detectados na análise de HPLC-MS/MS da *p*-NH₂-pBeet; (b) Estruturas possíveis para os íons detectados por análise por espectrometria de massas por infusão direta do complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7.

2-2.1.2. Estado de protonação dos complexos Bx@CB7

A determinação dos *pK*_{as} da pBeet e da *p*-NH₂-pBeet é fundamental para compreender seu comportamento em solução aquosa e a sua interação com CB7. Os *pK*_{as} das duas betalaínas e dos seus complexos de inclusão com cucurbit[7]urila foram determinados através da titulação espectrofotométrica e espectrofluorimétrica. Os espectros de absorção e de fluorescência foram adquiridos imediatamente após a preparação das soluções de trabalho das betalaínas em tampão Britton-Robinson (TpBR) pH 2 a 12. TpBR tem concentração 40 mmol L⁻¹ de citrato, acetato, fosfato e borato de sódio, cátion que dissocia o complexo Bx@CB7. Assim, os complexos Bx@CB7 foram preparados com amplo excesso de CB7 (20 equiv) e os tampões foram preparados em concentração de 10 mmol L⁻¹ para favorecer a complexação.

Os gráficos de contorno das mudanças nos espectros de absorção e fluorescência em função do pH para o complexo pBeet@CB7 são apresentados na Figura 22. As mudanças no espectro de absorção da pBeet em função do pH são sutis até o pH no qual a hidrólise se torna relevante ser atingido, característica comum a betalaínas naturais.^[21,46,94] Os gráficos de contorno mostram que a absorção de pBeet e pBeet@CB7 é máxima ao redor de 500 nm e a fluorescência em cerca de 560 nm, mas a diferença mais notável é o deslocamento dos contornos para pH mais altos no caso do complexo. O deslocamento do máximo de absorção em meio alcalino para comprimentos de onda mais curtos é resultado da hidrólise das betaxantinas para formar ácido betalâmico ($\lambda^{abs} = 424$ nm). A hidrólise acaba com a emissão de fluorescência nos dois casos. Esse resultado mostra que a presença de CB7 estabiliza as betaxantinas frente à hidrólise, fato que dá suporte adicional para a ocorrência de inclusão com CB7 e amplia a faixa de pH para a aplicação de betalaínas em meio aquoso.

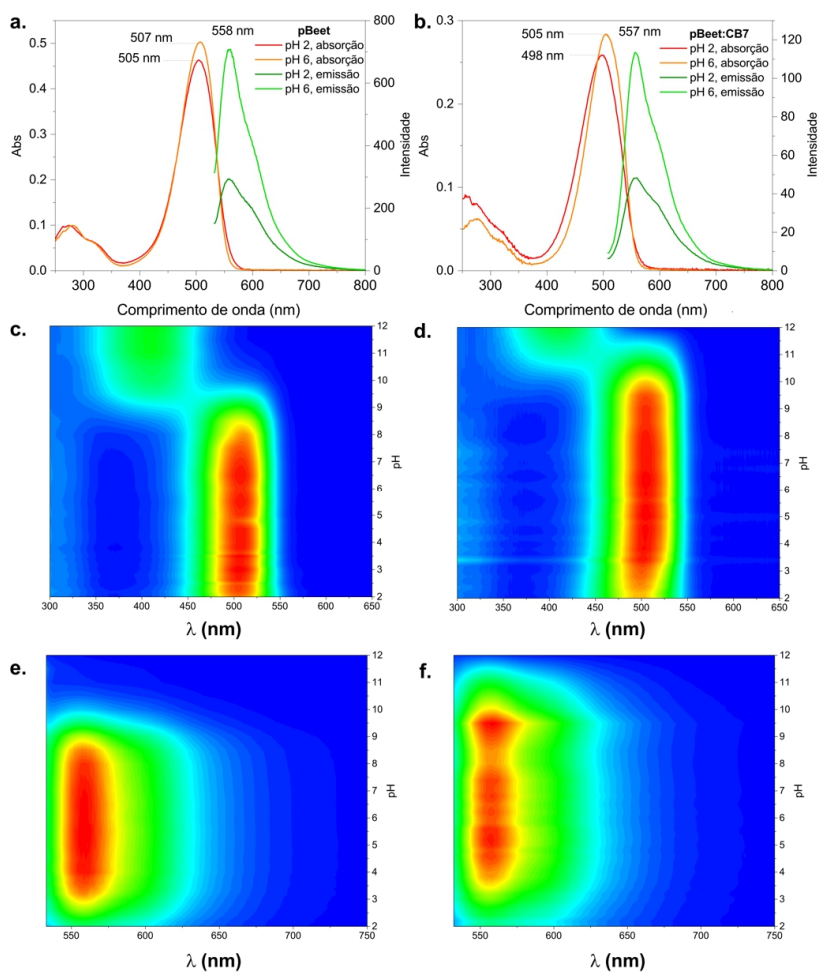


Figura 22. Titulação da pBeet e de pBeet@CB7. Espectros de absorção e emissão selecionados de (a) pBeet e (b) pBeet@CB7; curvas de contorno dos espectros de absorção em função do pH para (c) pBeet e (d) pBeet@CB7; curvas de contorno dos espectros de fluorescência em função do pH da (e) pBeet ($\lambda_{EX} = 500$ nm) e (f) pBeet@CB7 ($\lambda_{EX} = 470$ nm).

A presença do grupo amino livre na *p*-NH₂-pBeet modifica os gráficos de contorno de absorção ou fluorescência em função do pH (Figura 23a) em comparação à pBeet, apresentando uma clara inflexão e aumento da largura do contorno de absorção ao redor de pH 4 para a *p*-NH₂-pBeet e pH 5 para *p*-NH₂-pBeet@CB7. O comprimento de onda máximo de absorção da *p*-NH₂-pBeet na ausência de CB7 se desloca de 520 nm para 506 nm ($\Delta\lambda = 14$ nm, 532 cm^{-1} , Figura 23a) com quando o meio é acidificado (Figura 23c), fato que contrasta com o deslocamento de apenas 2 nm observado para pBeet (507 para 505 nm, 78 cm^{-1} , Figura 22a). Além disso, diferentemente do registrado para a pBeet, a inclusão em CB7 desloca o λ^{EM} de 551 nm para 545 nm, mas em ambos os casos não há alteração do λ^{EM} com o pH. A *p*-NH₂-pBeet é menos fluorescente em meio alcalino do que em meio ácido e a presença de CB7 amplia a faixa de pH em que possuímos essa betalaína na sua forma mais emissiva. O comportamento de hidrólise é análogo ao da pBeet, a presença de CB7 amplia a faixa de pH na qual a betalaína é estável.

A pBeet na presença e ausência de CB7 tem um pK_a ao redor de 3 (pBeet $pK_{a1} = 2,4$; pBeet@CB7 $pK_{a1} = 2,9$), medido pela curva de titulação por absorção e atribuído aos grupos ácido carboxílicos por comparação com dados da literatura.^[21–24,60] Determinações dos pK_a s da betanidina e do ácido betalâmico por cálculos computacionais mostram que o ácido carboxílico do carbono conjugado ao sistema 1,7-diazaheptametílico é o mais ácido (pK_a (C-6, betanidina) = 1,51 e pK_a (C-6, HBt) = 1,20), enquanto o pK_a do ácido carboxílico ligado ao C-2 é pK_a (C-2, betanidina) = 2,51 e pK_a (C-2, HBt) = 3,22.^[23,24] A análise da titulação por fluorescência mostra valores de pK_a aumentados em 0,2 unidades e que a desprotonação dos ácidos carboxílicos aumenta a fluorescência da pBeet em 2,5 vezes (Figura 24). A desprotonação dos ácidos carboxílicos da *p*-NH₂-pBeet não é observável por absorção, mas é possível estimar que os pK_{a1} s são mais baixos do que os da pBeet visto que a desprotonação também aumenta a fluorescência da *p*-NH₂-pBeet (*p*-NH₂-pBeet $pK_{a1} = 2,1$; *p*-NH₂-pBeet@CB7 $pK_{a1} = 2,8$, determinados por fluorescência). A diferença mais importante nos perfis das duas betaxantinas, entretanto, é a existência de um equilíbrio ácido-base com pK_a ao redor de 4,5 tanto para a *p*-NH₂-pBeet como para *p*-NH₂-pBeet@CB7 que não é observado para a pBeet e, portanto, deve estar relacionado ao grupo *p*-amino. A desprotonação converte o grupo NH₃⁺ atraente de elétron para o grupo NH₂ doador de elétron, o que está associado a uma diminuição na fluorescência.^[91] Caso esta atribuição esteja correta, o grupo amino seria um pouco mais básico do que o imino, possivelmente pela natureza *sp*² do átomo de nitrogênio imínico que aumenta a sua eletronegatividade e desde que a estabilização pela deslocalização dos pares de elétrons *n* do

N1 pelo sistema 1,7-diaza-heptametínio tenha pouco efeito. Considerando-se os pK_a s dos ácidos conjugados da anilina e da *p*-fenilenodiamina (anilina: $pK_{a1} = 4,87$; *p*-NH₂-pBeet: $pK_{a1} = 6,22$, $pK_{a2} = 2,99$)^[150] e o fato que o pK_a das iminas correspondentes ser tipicamente 2 a 4 unidades de pK_a mais baixo do que o da amina correspondente^[151,152] é plausível que o pK_a de 4,2 medido em água possa ser atribuído ao ácido conjugado do grupo *p*-amino e que o pK_{aH} do grupo imina seja igual ou maior que esse valor. Para as duas betaxantinas, observam-se na fluorescência um comportamento complexo ao redor de pH 4 que pode ou não ser atribuído à desprotonação do ácido conjugado da imina.

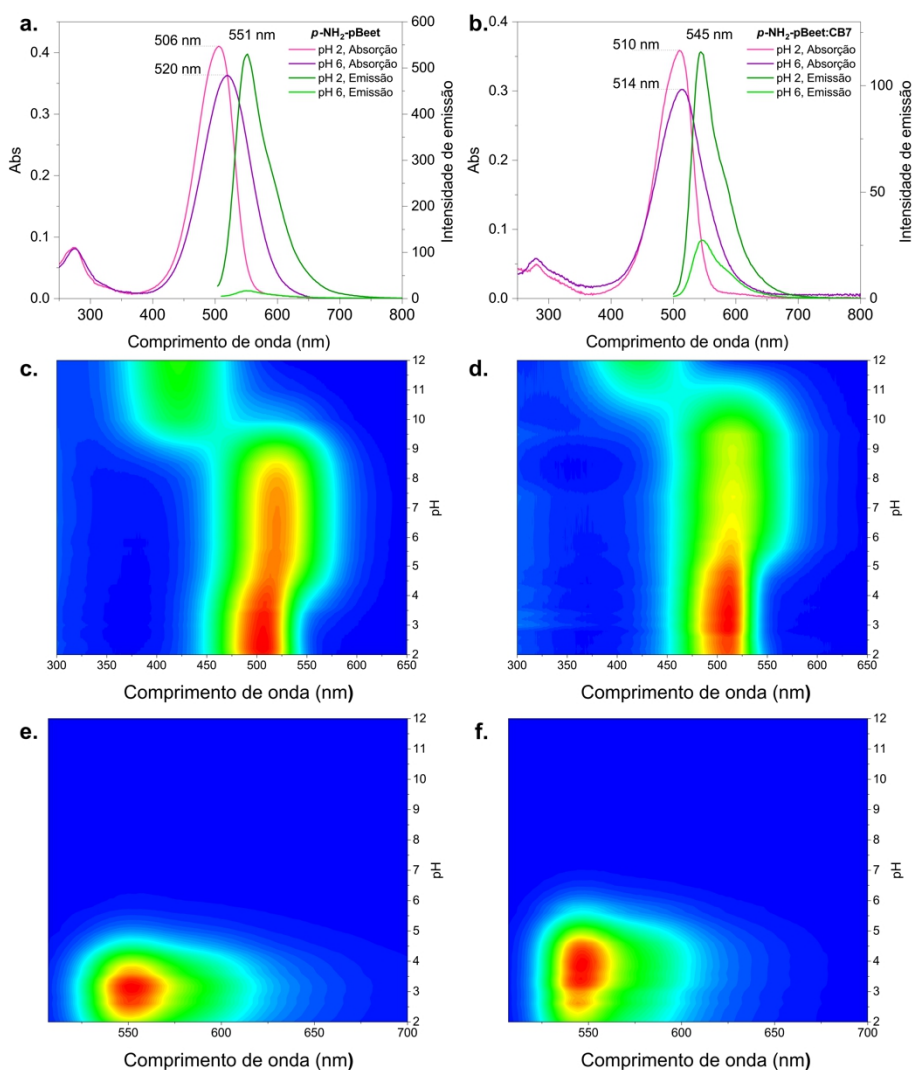


Figura 23. Titulação da *p*-NH₂-pBeet e de *p*-NH₂-pBeet @CB7. Espectros de absorção e emissão selecionados de (a) *p*-NH₂-pBeet e (b) *p*-NH₂-pBeet@CB7; curvas de contorno dos espectros de absorção em função do pH para (c) *p*-NH₂-pBeet e (d) *p*-NH₂-pBeet@CB7; curvas de contorno dos espectros de fluorescência em função do pH da (e) *p*-NH₂-pBeet ($\lambda_{EX} = 470$ nm) e (f) *p*-NH₂-pBeet@CB7 ($\lambda_{EX} = 470$ nm).

A inclusão da *p*-NH₂-pBeet em CB7 aumenta o p*K*_{aH} do grupo amino em uma unidade, de 4,2 para 5,2, ampliando a faixa de pH em que a forma *p*-NH₃⁺-pBeet é predominante – vide especificação no Anexo 21. Na ausência de CB7, o p*K*_{hid} da *p*-NH₂-pBeet é 0,4 unidades mais alto (2,5 vezes) que o da pBeet o que pode ser explicado considerando-se que o grupo amino diminui a eletrofilicidade do carbono imínico ou desfavorece a etapa de eliminação da *p*-fenilenodiamina. A hidrólise das duas betaxantinas complexadas tem p*K*_{hid} = 10,9 indicando que após a interação com duas unidades de CB7 com a *p*-NH₂-pBeet, o grupo *p*-amino tem pouca influência sobre a reatividade.

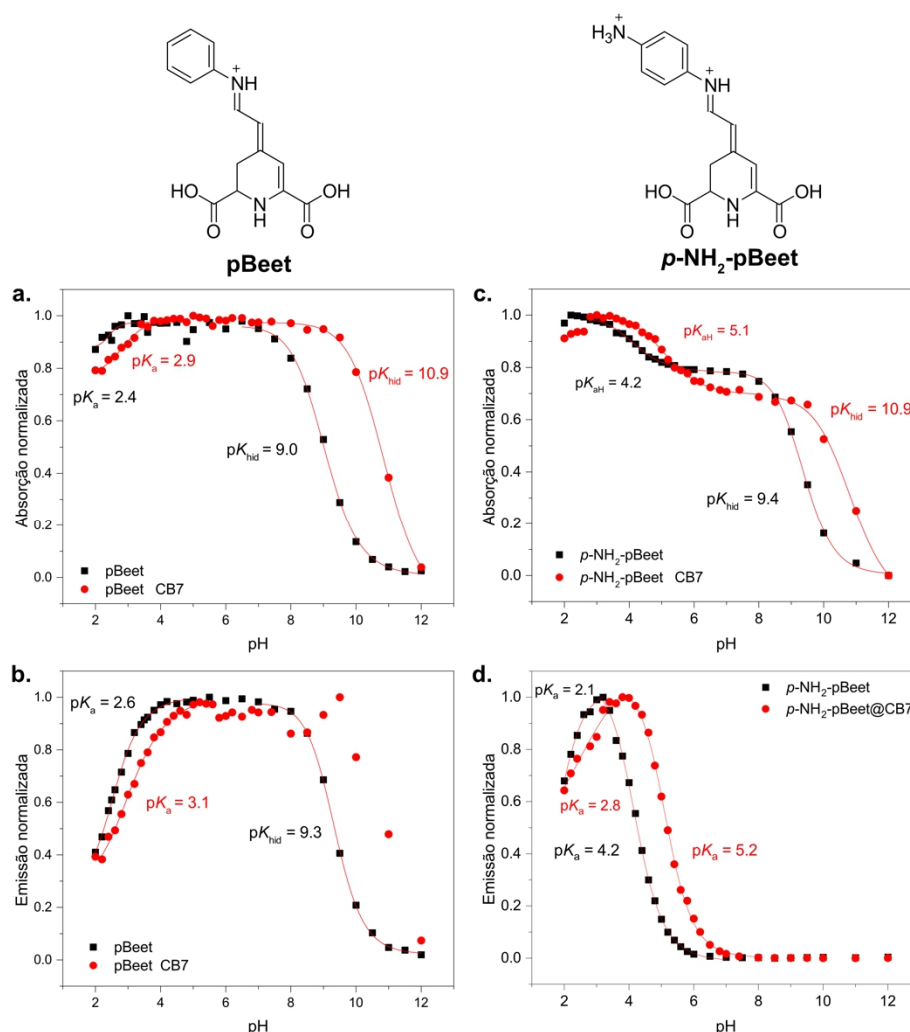


Figura 24. Titulação da pBeet e da *p*-NH₂-pBeet na presença e ausência de CB7. (a) curva de titulação por absorção normalizada com a pBeet em preto e complexo de inclusão pBeet@CB7 em vermelho. (b) curva de titulação por emissão normalizada com a pBeet em preto e complexo de inclusão pBeet@CB7 em vermelho. (c) curva de titulação por absorção normalizada com a *p*-NH₂-pBeet em preto e complexo de inclusão *p*-NH₂-pBeet@CB7 em vermelho. (d) curva de titulação por emissão normalizada com a (*p*-NH₂-pBeet em preto e complexo de inclusão *p*-NH₂-pBeet@CB7 em vermelho.

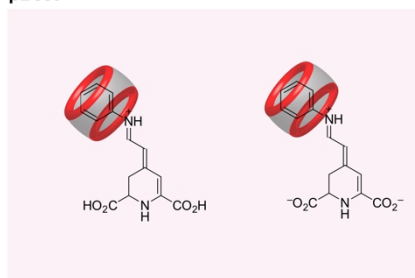
O aumento do pK_a provocado pela inclusão das betalaínas em cucurbit[7]urila implica na estabilização das betaxantinas protonadas, fato que está de acordo com o relatado para outras classes de ácidos carregados positivamente.^[121,126,143,153] Complexos formados entre CBs e espécies carregadas positivamente são mais estáveis comparados àqueles com os hóspedes desprotonados e o deslocamento do pK_a causado pela complexação é diretamente proporcional à essa estabilização por conta das interações entre íons com carga positiva e prótons com os dipolos das carbonilas constituintes dos portais da CB7.^{[122][154]} Dessa forma, propõe-se que o aumento do pK_{aH} do grupo amino da *p*-NH₂-pBeet seja promovido pela estabilização da carga positiva do íon amônio pelo portal da CB7 (Figura 25). O aumento do pK_a dos ácidos carboxílicos das duas betalaínas, por outro lado, é resultado da desestabilização da forma desprotonada devido à repulsão da carga negativa dos carboxilatos com os portais da CB7 e pela eventual estabilização dos ácidos carboxílicos protonados, seja pela água ou pela interação via ligação de hidrogênio com as carbonilas dos portais. Esse efeito também foi observado em complexos de inclusão entre CB7 e aminoácidos e peptídeos.^[155] Enquanto a variação de pK_a do grupo amino provocada pela CB7 é de uma ordem de grandeza, no ácido carboxílico ela é de 0,5, o que pode estar relacionado à posição da CB7 na molécula, que está localizada na região do anel aromático e portanto mais próxima do grupo amino (Figura 25). Para ilustrar as dimensões do macrociclo em relação às betaxantinas, é apresentado um desenho dos complexos pertinentes para o estudo (Figura 25).

Para enriquecer a discussão sobre as propriedades da *p*-NH₂-pBeet no estado excitado, determinaram-se os pK_{as} no estado excitado (pK_a^*) aplicando o ciclo de Förster.^[153,156,157] Essa abordagem baseia-se no princípio de que há um equilíbrio termodinâmico ácido-base tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. De modo simplificado, a Eq. 4 relaciona o pK_a e o pK_a^* .

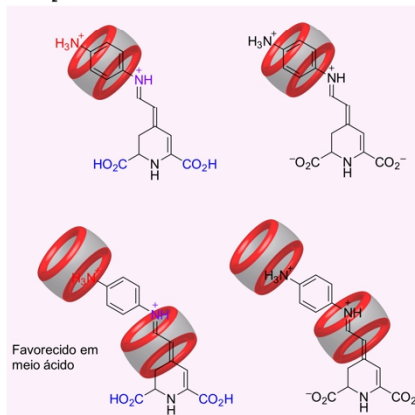
$$pK_a^* = pK_a + 2,1 \times 10^{-3} (\bar{v}_{A^-} - \bar{v}_{AH}) \quad \text{Eq. 5}$$

O pK_a do grupo NH₃⁺ muda de 4,2 para 3,5 no estado excitado, enquanto para a forma *p*-NH₃⁺-pBeet@CB7 a variação é de 5,2 no estado fundamental para 4,7 no excitado. Desta forma, não se esperam variações muito grandes de comportamento das espécies no estado excitado.

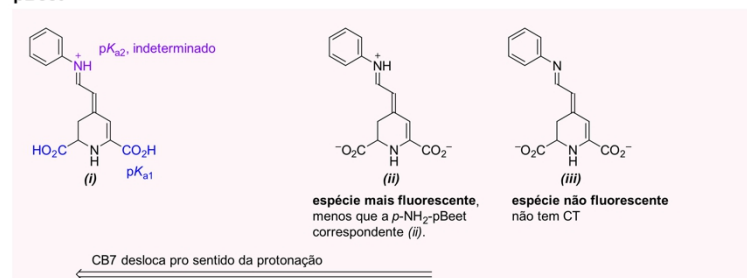
(a) Localização da CB7 na betaxantina pBeet



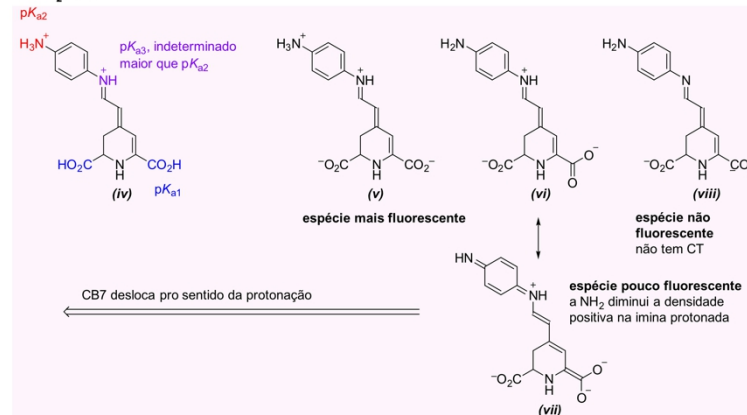
p-NH₂-pBeet



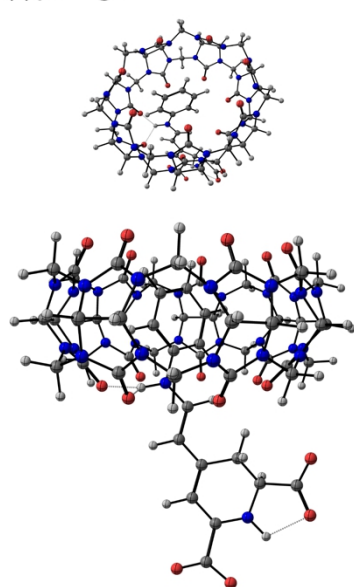
(b) Estados de protonação das betaxantinas pBeet



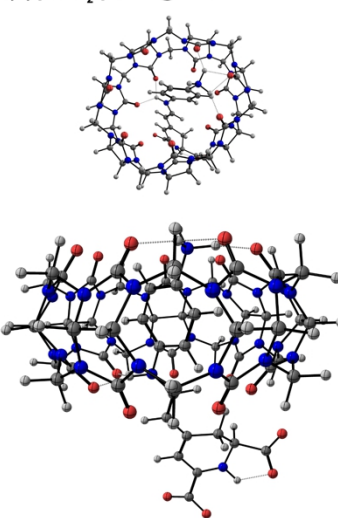
p-NH₂-pBeet



(c) pBeet@CB7



(d) *p*-NH₂-pBeet@CB7



(e) *p*-NH₂-pBeet@2CB7

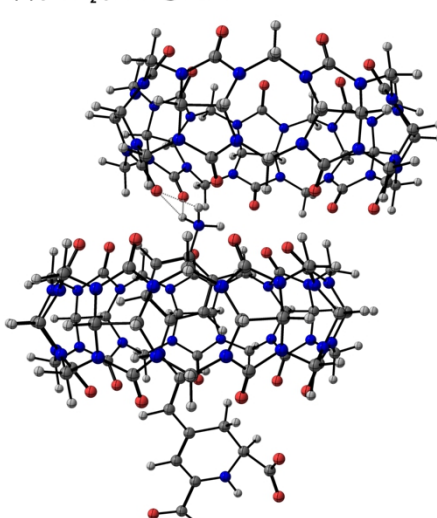


Figura 25. Visão sistematizada dos resultados obtidos com a inclusão de pBeet e *p*-NH₂-pBeet em CB7. (a) Localização inferida para as CB7 nos complexos de inclusão. (b) Efeito da CB7 sobre os pK_as e pK_{aHS} dos grupos ácidos e básicos das betaxantinas e sistematização dos resultados obtidos com fluorescência. Representações estruturais pré-otimizadas com método semiempírico PM7 em contínuo com propriedades da água (400 iterações) para ilustrar as dimensões da CB7 em relação à (c) pBeet, (d) *p*-NH₂-pBeet no complexo 1:1 e (e) *p*-NH₂-pBeet no complexo 2:1; essas representações não devem ser consideradas como estruturas otimizadas.

Para concluir essa etapa do trabalho, foram feitas medidas de dicroísmo circular eletrônico (ECD) na tentativa de entender o que ocorre com o carbono assimétrico das betalaínas quando ocorre a complexação com CB7. Observa-se um sinal claro para *p*-NH₂-pBeet em água com desvio positivo em 250 nm e negativo em 275 nm. Na presença de CB7, esses sinais são alargados, bem como o sinal com desvio mínimo observado entre 300 e 350 nm, sugerindo que há duas formas da betaxantina que respondem à luz circularmente polarizada. Além disso, há o aparecimento de um sinal com desvio positivo em 215 nm. A acidificação do meio com HCl 2,0 mmol L⁻¹ provoca um alargamento dos sinais mais sutil, mas na mesma direção, bem como o aparecimento do sinal próximo a 210 nm, sugerindo que esse conjunto de sinais possa estar relacionado com a protonação dos ácidos carboxílicos. Em meio ácido com CB7, o sinal positivo em 210 nm é muito intensificado em relação aos sinais em 250 nm, mas o espectro se torna mais resolvido, sugerindo a presença de uma forma majoritária totalmente protonada.

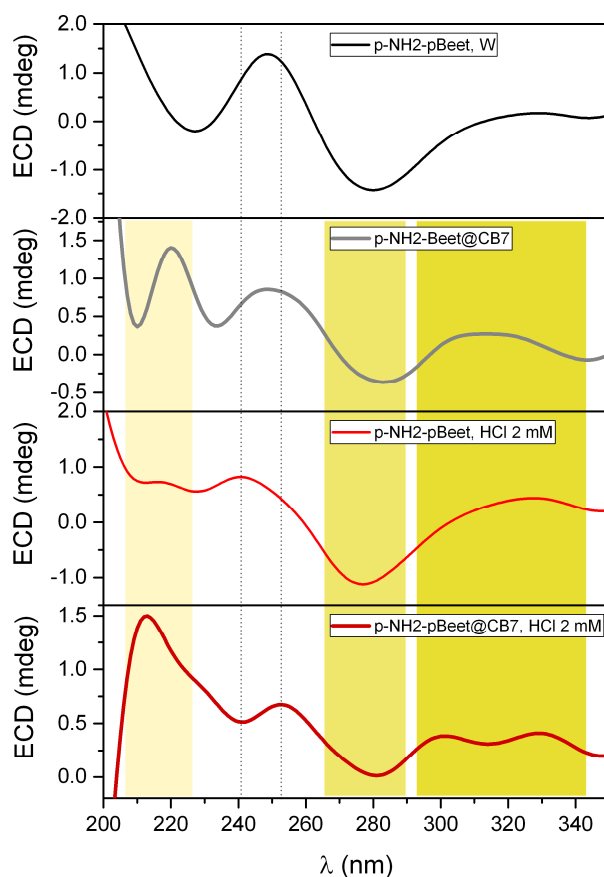


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular eletrônico de *p*-NH₂-pBeet em diferentes condições. Os dados originais foram submetidos a um alisamento com filtro Savitzky–Golay com espaço de 10 pontos para simplificação.

2-2.2. Estabilidade hidrolítica de Bx@CB7

Após a caracterização de algumas propriedades das betalaínas, investigou-se se CB7 estabiliza essas betaxantinas-modelo frente à hidrólise em tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ (TpP) com pH 2,5 ou 6,9. As cinéticas de decomposição a 25 °C foram acompanhadas por espectroscopia de absorção UV-Vis e foram realizadas com os correspondentes do tampão deuterado para a obtenção de dados de efeito isotópico de solvente (EIS) visando elucidação mecanística. Quando necessário, o símbolo *L* (de liônio ou liato) será usado para representar de forma genérica H ou D.^[158] O pL para a realização dos experimentos foi escolhido baseado na faixa da curva titulação na qual a constante de hidrólise observada não depende do pH para facilitar a análise dos dados. O pD da solução de tampão deuterado foi medido utilizando-se um pHmetro e foi corrigido de acordo com $pD = pH \text{ medido} + 0,4$ por causa da diferença de acidez entre H₂O e D₂O.^[159] Os espectros de absorção adquiridos em função do tempo e os respectivos decaimentos exponenciais são apresentados na Figura 27 (pBeet) e na Figura 28 (*p*-NH₂-pBeet) e as constantes cinéticas obtidas através do ajuste exponencial dos dados cinéticos das betalaínas e efeitos isotópicos do solvente estão na Tabela 6.

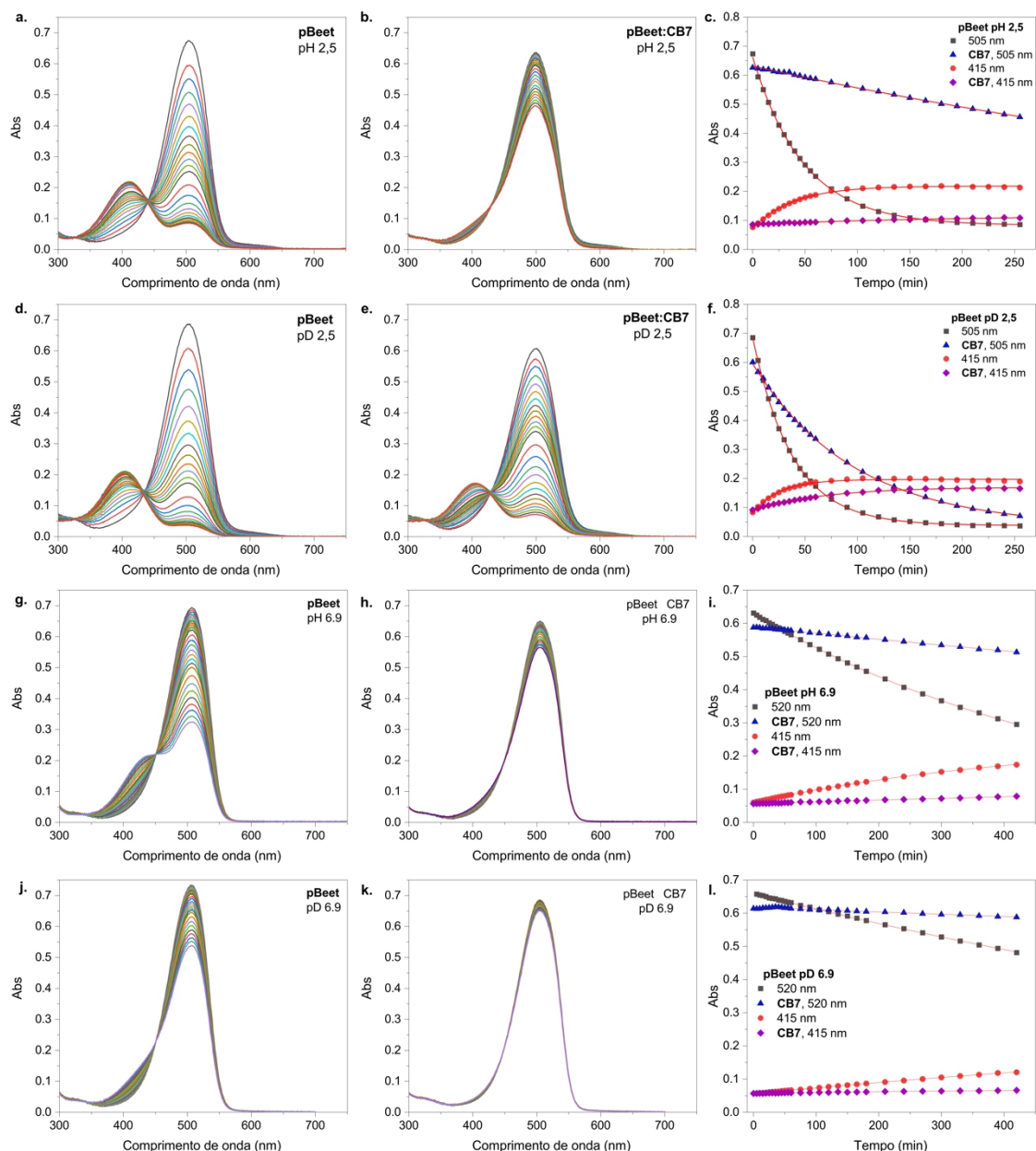


Figura 27. Cinéticas de decomposição da pBeet em tampão fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nas seguintes condições: (a) pBeet em pH 2,5 (tampão aquoso); (b) pBeet@CB7 (5 equiv.) em pH 2,5; (d) pBeet em pD 2,5 (tampão deuterado); (e) pBeet@CB7 (5 equiv.) em pD 2,5; (g) pBeet em pH 6,9; (h) pBeet@CB7 (5 equiv.) em pH 6,9; (j) pBeet em pD 6,9; (k) pBeet@CB7 (5 equiv.) em pD 6,9; (c), (f), (i), (l) decaimentos e ajustes exponenciais em comprimentos de onda selecionados. Para os ajustes exponenciais no λ da betalaína em pH/pD 6,9, y_0 foi fixado em 0.

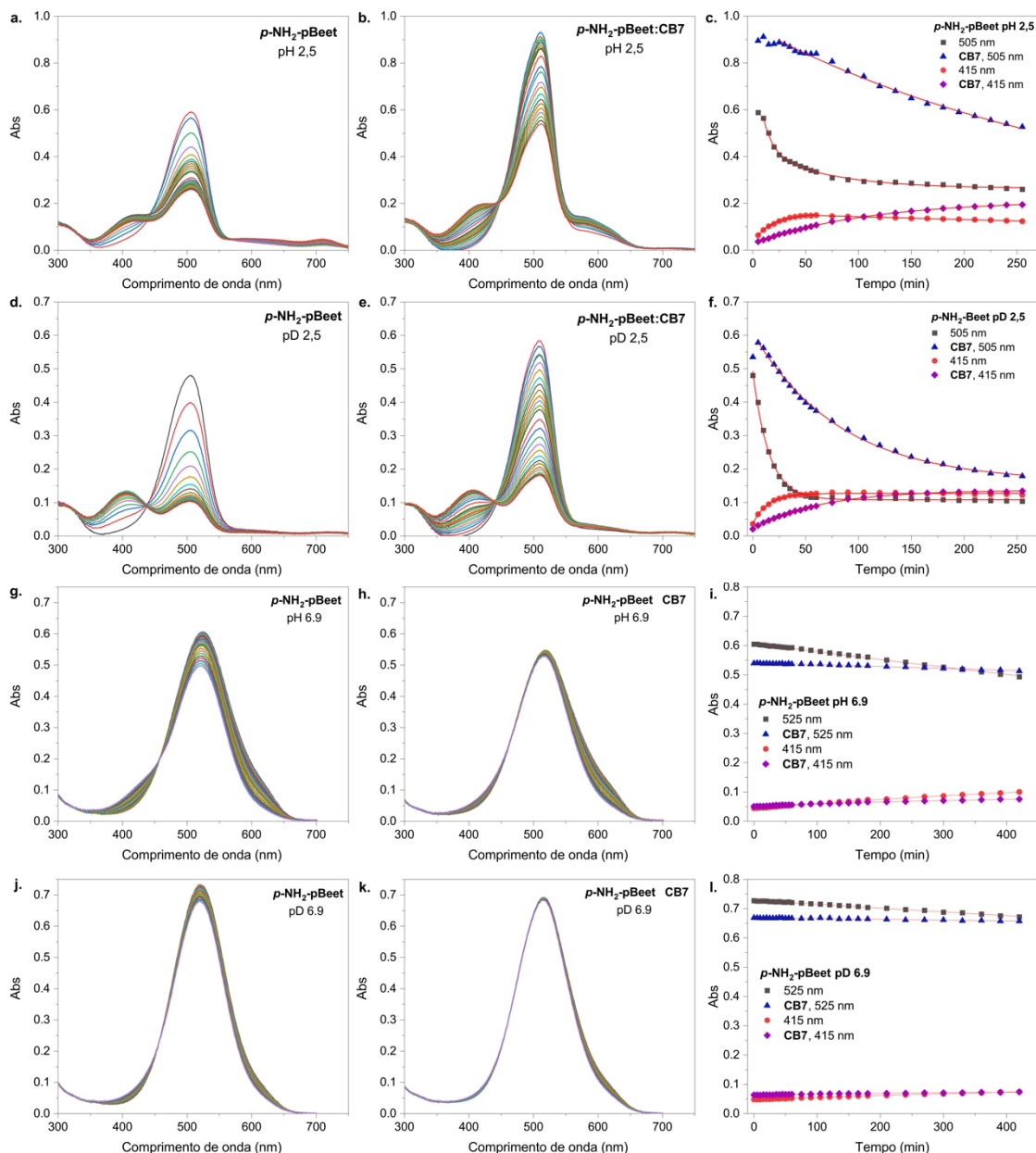


Figura 28. Cinéticas de decomposição da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em tampão fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} a 25°C nas seguintes condições: (a) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em pH 2,5 (tampão aquoso); (b) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet@CB7}$ (5 equiv.) em pH 2,5; (d) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em D_2O pD 2,5 (tampão deuterado); (e) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet@CB7}$ (5 equiv.) em pD 2,5; (g) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em pH 6,9; (h) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet@CB7}$ (5 equiv.) em pH 6,9; (j) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em pD 6,9; (k) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet@CB7}$ (5 equiv.) em pD 6,9; (c), (f), (i), (l) decaimentos e ajustes exponenciais em comprimentos de onda selecionados. Para os ajustes exponenciais no λ da betalaina em pH/pD 6,9, y_0 foi fixado em 0.

Tabela 6. Constantes observadas das cinéticas de decomposição a 25 °C de pBeet e *p*-NH₂-pBeet na ausência e presença de cucurbit[7]urila, em pH 2,5 e 6,9, em tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ aquoso ou deuterado.

λ (nm)	$k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}}$ /10 ⁻⁴ s ⁻¹	$k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}}$ /10 ⁻⁴ s ⁻¹	$k^{\text{H}_2\text{O}}/k^{\text{D}_2\text{O}}$	$k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O,CB7}}$ /10 ⁻⁴ s ⁻¹	$k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O,CB7}}$ /10 ⁻⁴ s ⁻¹	$k^{\text{H}_2\text{O}}/k^{\text{D}_2\text{O}}$ (CB7)
pBeet, pH 2,5						
505	3,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,77 ± 0,02	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,19 ± 0,06
415	4,2 ± 0,2	5,2 ± 1,8		1,3 ± 0,7	1,9 ± 0,7	
<i>p</i>-NH₂-pBeet, pH 2,5						
505	9,5 ± 1,0 ^a	11 ± 2	0,85 ± 0,11	0,68 ± 0,23	1,9 ± 0,4	0,36 ± 0,10
415	11 ± 3	15 ± 8		1,6 ± 0,47	4,1 ± 3,0	
pBeet, pH 6,9						
520 ^b	0,31 ± 0,01	0,13 ± 0,01	2,4 ± 0,10	0,10 ± 0,05	0,04 ± 0,02	2,7 ± 0,21
<i>p</i>-NH₂-pBeet, pH 6,9						
525 ^b	0,08	0,03	2,6	0,02	0,007	2,9

^a Ajuste com função bi-exponencial, valor de $k_{\text{obs}2}^{\text{H}_2\text{O}}$ é $1,4 \pm 2,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

^b As constantes estimadas em 415 nm são imprecisas devido à pequena formação de HBt nessas condições.

Em meio ácido, pBeet está sujeita a descarboxilação e hidrólise, conforme previamente observado em outros estudos com pBeet e betanina e no capítulo 1 dessa Tese.^[19,22] Sua constante de velocidade em meio ácido é similar à observada para a formação do HBt, produto da hidrólise (Figura 27, Tabela 6). CB7 diminui a velocidade de decomposição da pBeet em 14 vezes ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 8 \text{ h}$ vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 34 \text{ min}$). A decomposição da pBeet é mais rápida em pD 2,5 comparado a pH 2,5 e, apesar da CB7 ainda proteger a pBeet frente à decomposição, esse efeito é menor (3 vezes, $t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 89 \text{ min}$ vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 26 \text{ min}$).

Devido a maior persistência da pBeet em meio neutro, o termo y_0 da função exponencial foi fixado em zero para os cálculos de k_{obs} . A decomposição da pBeet em pH 6,9 ($t_{1/2} = 6,2 \text{ h}$) é 11 vezes mais lenta do que em pH 2,5 ($t_{1/2} = 34 \text{ min}$). A presença de um ponto isobéstico em 453 nm e o aumento da absorção em 415 nm indicam que, assim como em pH 2,5, pBeet foi convertida em ácido betalâmico em meio neutro. O efeito de estabilização provocado pela CB7 é de 3 vezes ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 19 \text{ h}$ vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 6,2 \text{ h}$), o que é um aumento considerável na estabilidade da betalaína, mas não tão pronunciado quanto o observado em meio ácido. Em TpP deuterado pD 6,9, a decomposição da pBeet na ausência e na presença de CB7 é mais lenta do que em pH 6,9, efeito oposto ao que ocorre em meio ácido, mas a CB7 aumenta a persistência da pBeet na mesma extensão que no tampão aquoso.

As cinéticas de decomposição da *p*-NH₂-pBeet são apresentadas na Figura 28. Em pH 2,5 o ajuste dos dados da decomposição da *p*-NH₂-pBeet (monitorada em 505 nm) demandou uma função com duas exponenciais somadas, o que levou à determinação de duas constantes cinéticas. A análise espectrofotométrica da amostra revelou a presença de WireBeet (betalaína produto da reação entre *p*-NH₂-pBeet e HBt, $\lambda_{\text{abs}} = 578$ nm), que deve ter se originado no processo de liofilização da *p*-NH₂-pBeet pura para armazenamento e posterior solubilização em H₂O ou D₂O. De fato, o valor da constante observada mais baixa varia consideravelmente dependendo da quantidade inicial de WireBeet na amostra. Após algumas horas, observou-se a formação de um precipitado azul, correspondente à WireBeet, indicando que esse composto pode ser preparado convenientemente em meio ácido. A presença de CB7 inibe a formação de WireBeet, havendo apenas a conversão da *p*-NH₂-pBeet em ácido betalâmico, conforme sugere o ponto isobéstico em 445 nm, e sem a formação de precipitado. Além disso, a CB7 aumenta a persistência da *p*-NH₂-pBeet em meio aquoso ácido em 14 vezes em relação à betalaína livre ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 2,8$ h vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 12$ min). O decaimento de *p*-NH₂-pBeet em TpP pD 2,5 pôde ser ajustado com uma função monoexponencial, sugerindo que o meio deuterado inibe a formação de WireBeet. O complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7 é mais persistente em meio ácido do que a betalaína livre ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 1$ h vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 10,5$ min), mas a estabilização provocada pela cucurbiturila em tampão aquoso é maior do que em tampão deuterado.

Devido à alta estabilidade da *p*-NH₂-pBeet em TpP pH 6,9, o y_0 foi fixado como 0 para possibilitar a determinação das k_{obs} através de ajustes não-lineares. A CB7 triplica o tempo de meia-vida de *p*-NH₂-pBeet em TpP pH 6,9 ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 74$ h vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 24$ h). Em TpP pD 6,9, CB7 estabiliza a *p*-NH₂-pBeet em cerca de 4 vezes ($t_{1/2}^{\text{Bx@CB7}} = 275$ h vs. $t_{1/2}^{\text{Bx}} = 64$ h). De forma geral, a betalaína e o seu complexo com CB7 são mais estáveis em D₂O do que em H₂O, assim como observado nos experimentos com pBeet nas mesmas condições. Em TpP pH 6,9, *p*-NH₂-pBeet se decompõe 4 vezes mais lentamente do que pBeet visto que o grupo NH₂ diminui a eletrofilicidade do carbono imínico. O mesmo efeito é observado em pD 6,9, embora em tampão deuterado as reações tenham se tornado mais lentas, com efeito isotópico de solvente próximo a 2,5 (Tabela 6). A presença de CB7 não muda o fato de *p*-NH₂-pBeet ser mais estável frente à hidrólise comparado à pBeet, mas diminui a velocidade de hidrólise em pH ou pD 6,9 de 3 e 4 vezes em relação aos respectivos controles sem CB7.

Existem duas etapas que poderiam ser lentas na hidrólise das betalaínas: o ataque nucleofílico da água ao carbono carbonílico eletrofílico da imina (K_{AdL} via hétero AdE3 ou $K_{\text{eq}}K_{\text{Ad}}$ via AdE2 seguida de AdN) e a etapa de eliminação da amina para produzir o ácido betalâmico (K_{E}) (Figura 29). Considerando que os efeitos isotópicos de solvente para as

hidrólises de pBeet e *p*-NH₂-pBeet são, respectivamente, 2,4 e 2,6 o ataque da água reforçado pela transferência de próton pelo LO₃⁺ (*K*_{AdL}, AdE3) tem os atributos necessários para ser considerado a etapa lenta.^[160] A protonação da imina é bastante improvável em meio neutro, assim como o ataque da água para formação de uma base forte.^[161] Na presença de CB7, em pH/pD 6,9 não há grande mudança no EIS em relação à sua ausência, indicando que a CB7 não altera o mecanismo da hidrólise, apesar de contribuir com a estabilização cinética das betaxantinas protegendo o carbono carbonílico do ataque nucleofílico da L₂O.

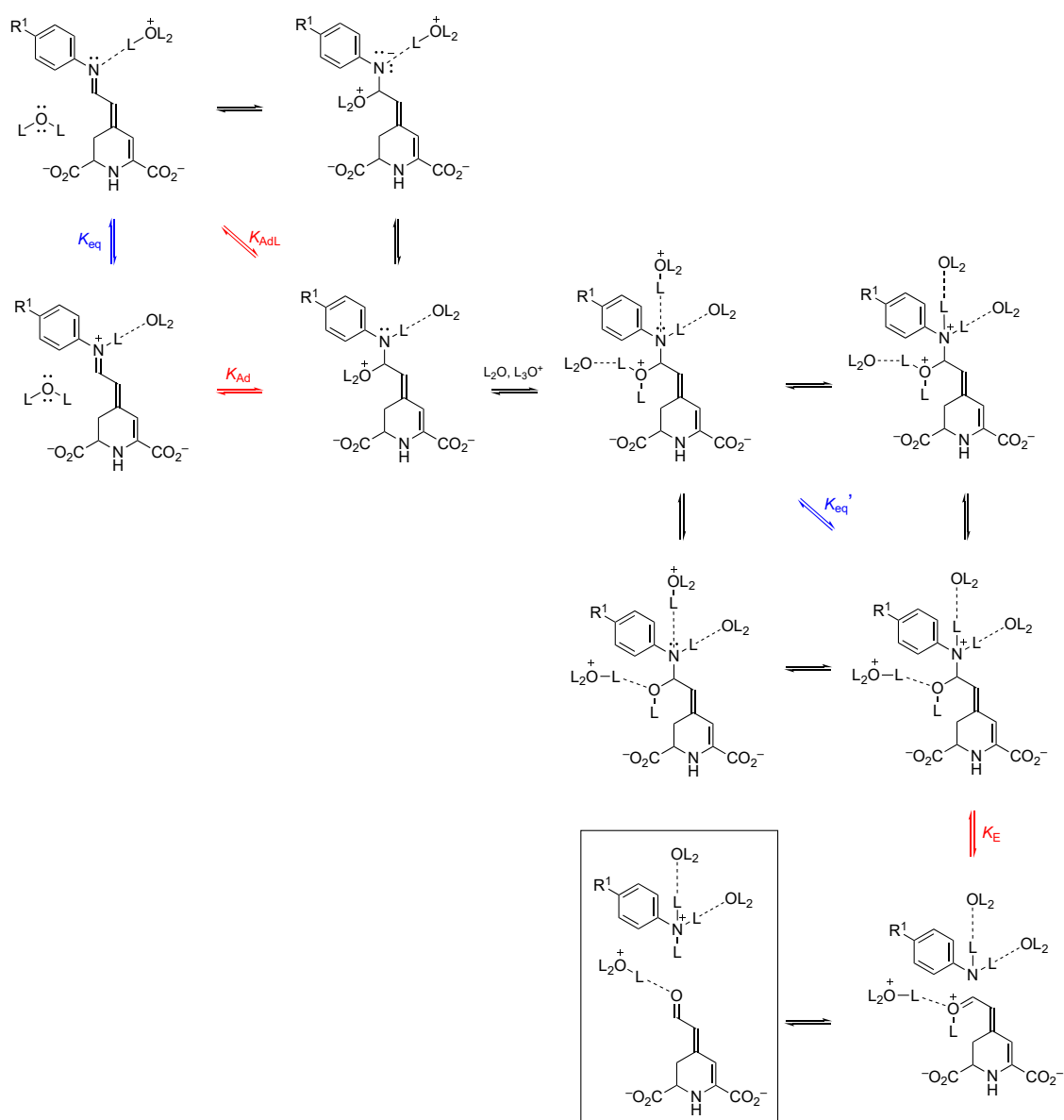


Figura 29. Proposta mecanística para a conversão de pBeet, R¹ = H, ou *p*-NH₂-pBeet, R¹ = NH₂, em pH/pD 6,9. Equilíbrios marcados em vermelho representam possíveis etapas lentas, em azul são apresentados os equilíbrios que antecedem estas possíveis etapas lentas. Moléculas de solvente são apresentadas de forma explícita para referência. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

Em TpP pH 2,5, a $p\text{-NH}_3^+\text{-pBeet}$ se decompõe cerca de três vezes mais rápido do que pBeet visto que o grupo NH_3^+ aumenta a eletrofilicidade do carbono imínico por efeito indutivo atraente de elétron. Os valores de k_{obs} são ligeiramente mais altos em pD 2,5, resultando em um efeito isotópico inverso de 0,8 para ambas as betalaínas.^[162] Essa mudança na magnitude do efeito isotópico cinético do solvente pode ser interpretado como uma mudança na etapa determinante da velocidade da reação em meio ácido em relação ao pH/pD 6,9, fato não observado na hidrólise de betanina.^[22]

Valores de efeito isotópico de solvente inverso relacionam-se a fatores de fracionamento menores que um, refletindo a preferência de determinado grupo por D no lugar de H em comparação à proporção isotópica no âmago (*bulk*) do solvente. Efeitos isotópicos de solvente (EIS) normais são o resultado de efeitos isotópicos cinéticos do solvente (EICS), de efeitos isotópicos de equilíbrio do solvente (EIES) ou de uma combinação dos dois. EIS inverso, por outro lado, é quase sempre dominado por EIES com equilíbrios mais deslocados para o produto em D_2O comparado a H_2O . Quando um EIES precede a etapa limitante da reação e descreve o comportamento de um equilíbrio rápido, ele se manifesta no EIS.^[158] Para um processo simples de duas etapas, ou seja, equilíbrio (K_{eq}) seguido da etapa lenta (k), o valor de k_{obs} é determinado por:

$$k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}} = K_{\text{eq}}^{\text{D}_2\text{O}} \times k^{\text{D}_2\text{O}} \quad \text{Eq. 6}$$

Em geral, o $\text{p}K_{\text{a}}$ de grande parte dos ácidos de Brønsted monoproticos é 0,48 unidades mais alto em D_2O do que em H_2O , graças ao fator de fracionamento do L_3O^+ que é 0,69.^[158] Assim, o $\text{p}K_{\text{a}}$ das porções carboxílicas das betaxantinas é maior que 3,0 e o $\text{p}K_{\text{aH}}$ da porção p -amino da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ tende a 5 em D_2O . Portanto, a mudança de meio aquoso para D_2O não altera as espécies reagentes em pL 2,5 e 6,9. Contudo, a etapa de eliminação da amina é precedida por uma transferência de próton (K_{eq}') que foi interpretada como rápida, i.e., $k_1 \gg k_{-1}$, e que favorece o estado protonado da amina em meio deuterado.

Em meio ácido, os valores do EIS inverso são ainda menores na presença de CB7, o que indica que o pré-equilíbrio de transferência de próton na carbinolamina é mais deslocado no sentido da forma na qual a anilina está protonada em D_2O do que em H_2O e/ou que a constante cinética do passo de eliminação é mais alta em D_2O (Figura 30). Os portais das CB7 possuem oxigênios sp^2 que estabilizam a carbinolamina protonada recebendo ligações de hidrogênio e D_2O faz ligações de hidrogênio mais fracas comparadas a H_2O .^[163] Dessa forma, na presença de CB7 e D_2O o equilíbrio de protonação está mais deslocado para a carbinolamina protonada

no N9 visto que o portal da CB7 estabiliza essa espécie na presença de D₂O de forma mais efetiva do que em H₂O. Além disso, o mesmo efeito deve estabilizar o estado de transição que leva ao ácido betalâmico, aumentando a distância C–N. Essa explicação encontra suporte em dados de EIC inverso obtidos na hidrólise de epóxidos nos quais valores de EIC ~ 0.7 estariam relacionados à um estado de transição mais covalente e parecido com S_N2 enquanto EIC < 0.7 envolve a formação de carbocátion.^[162] Essa análise desconsidera completamente o fato do D₂O ser 24% mais viscoso que H₂O ($\eta^D = 1,2514$ vs. $\eta^H = 1,0050$, 20 °C).^[164]

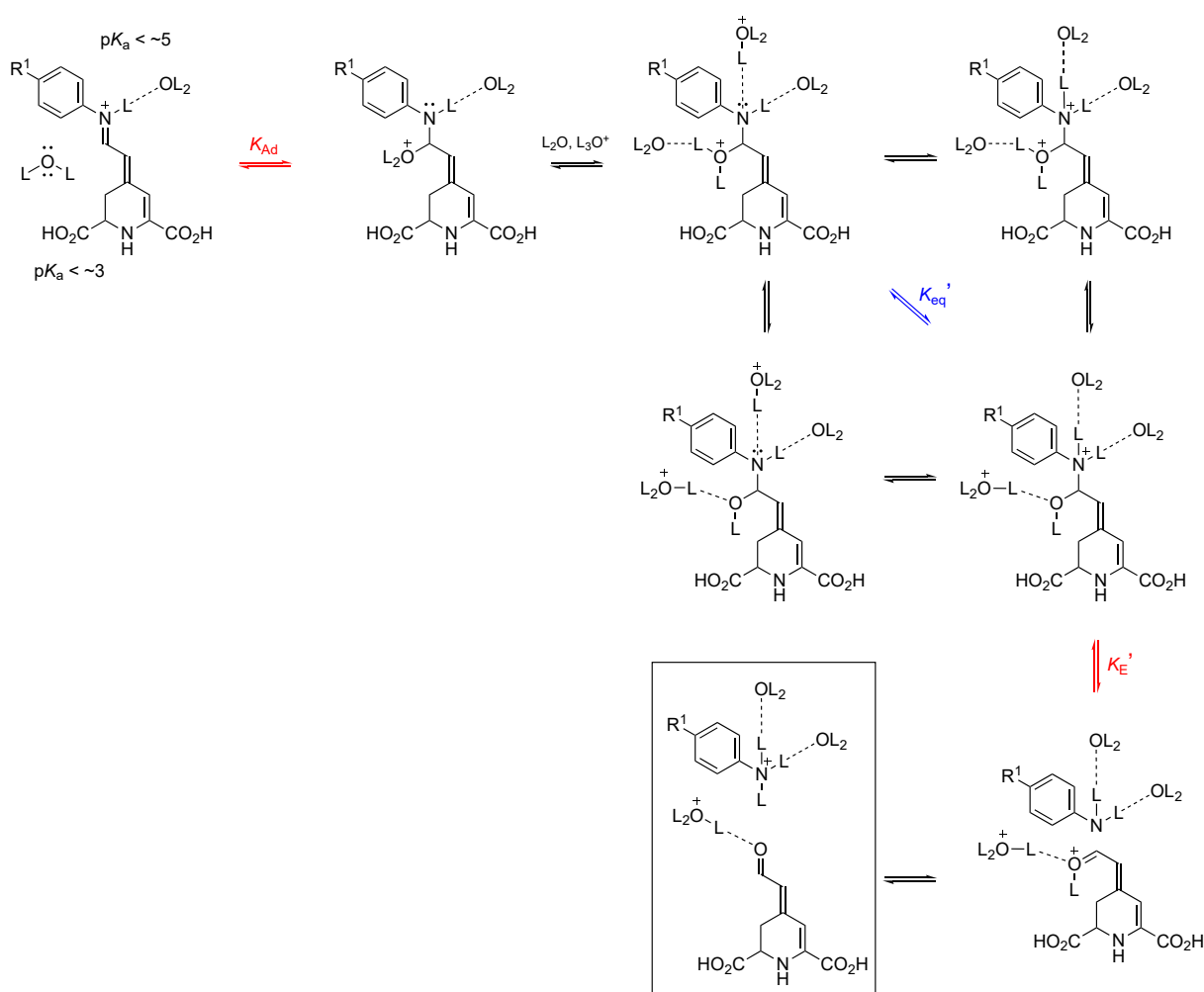


Figura 30. Proposta mecanística para a conversão de pBeet, R¹ = H, ou *p*-NH₂-pBeet, R¹ = NH₂, em pH/pD 2,5. Equilíbrios marcados em vermelho representam possíveis etapas lentas, em azul são apresentados os equilíbrios que antecedem possíveis etapas lentas. Moléculas de solvente são apresentadas de forma explícita para referência. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

2-2.3. Propriedades dos estados excitados de betaxantinas complexadas

2-2.3.1. Fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência da pBeet e *p*-NH₂-pBeet e dos respectivos complexos com cucurbit[7]urila (5 equiv.) foram determinados com medidas de estado estacionário em pH 6 (tampão fosfato de sódio, TpP, 10 mmol L⁻¹) e em pH 2 (tampão citrato de sódio, TpC, 10 mmol L⁻¹) utilizando-se rodamina B em metanol como padrão de fluorescência. Os resultados são apresentados na Tabela 7. Em pH 6, a pBeet é cinco vezes mais fluorescente do que *p*-NH₂-pBeet visto que o grupo NH₂ é doador de elétrons por efeito mesomérico e diminui a emissão, como observado para betaxantinas aromáticas em geral.^[91] Em meio ácido, a protonação do grupo NH₂ leva ao grupo NH₃⁺ que é atraente de elétron por efeito indutivo e, por consequência, resulta em maior fluorescência da *p*-NH₃⁺-pBeet comparada com a pBeet. Os espectros de excitação da *p*-NH₂-pBeet sugerem que apenas a espécie com o grupo amino protonado é emissiva pois o espectro de excitação em pH 6 não é sobreponível com o espectro de absorção correspondente, mas sim com o espectro de absorção em pH 2 (Anexo 20). Em pH 6 e na presença de CB7, *p*-NH₂-pBeet é mais fluorescente que pBeet possivelmente pela restrição vibracional e conformacional. Esse efeito se torna mais dramático em pH 2, onde a *p*-NH₃⁺-pBeet é uma ordem de grandeza mais fluorescente que a pBeet.

Betalaínas tem uma via de desativação não-radiativa do estado excitado singlete que reduz significativamente os tempos de vida de fluorescência.^[96] Assim foram realizados experimentos de espectroscopia resolvida no tempo de vida de fluorescência na Universidade de Uppsala em colaboração com o Prof. Dr. Jacinto Sá para caracterizar espectroscopicamente a(s) espécie(s) emissiva(s). Os experimentos foram realizados usando um sistema de lasers Ti-Safira operando com uma frequência de repetição de 200 kHz, duração de pulso < 270 fs e excitação (*pump*) em 500 nm e uma *streak camera* para detecção. Os contornos da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda e do intervalo de tempo entre o pulso e a análise obtidos para as soluções de *p*-NH₂-pBeet e pBeet e dos seus respectivos complexos com cucurbit[7]urila (5 equiv.) em água em meio neutro ou após acidificação com HCl (pH 2), são mostrados nas Figura 31 e Anexo 22. Os tempos de vida de fluorescência (τ_{FI}) obtidos a partir do ajuste não linear de uma função monoexponencial aos dados da *streak camera* simultaneamente em todos os comprimentos de onda estão na Tabela 7, em conjunto com os rendimentos quânticos de fluorescência nas mesmas condições.

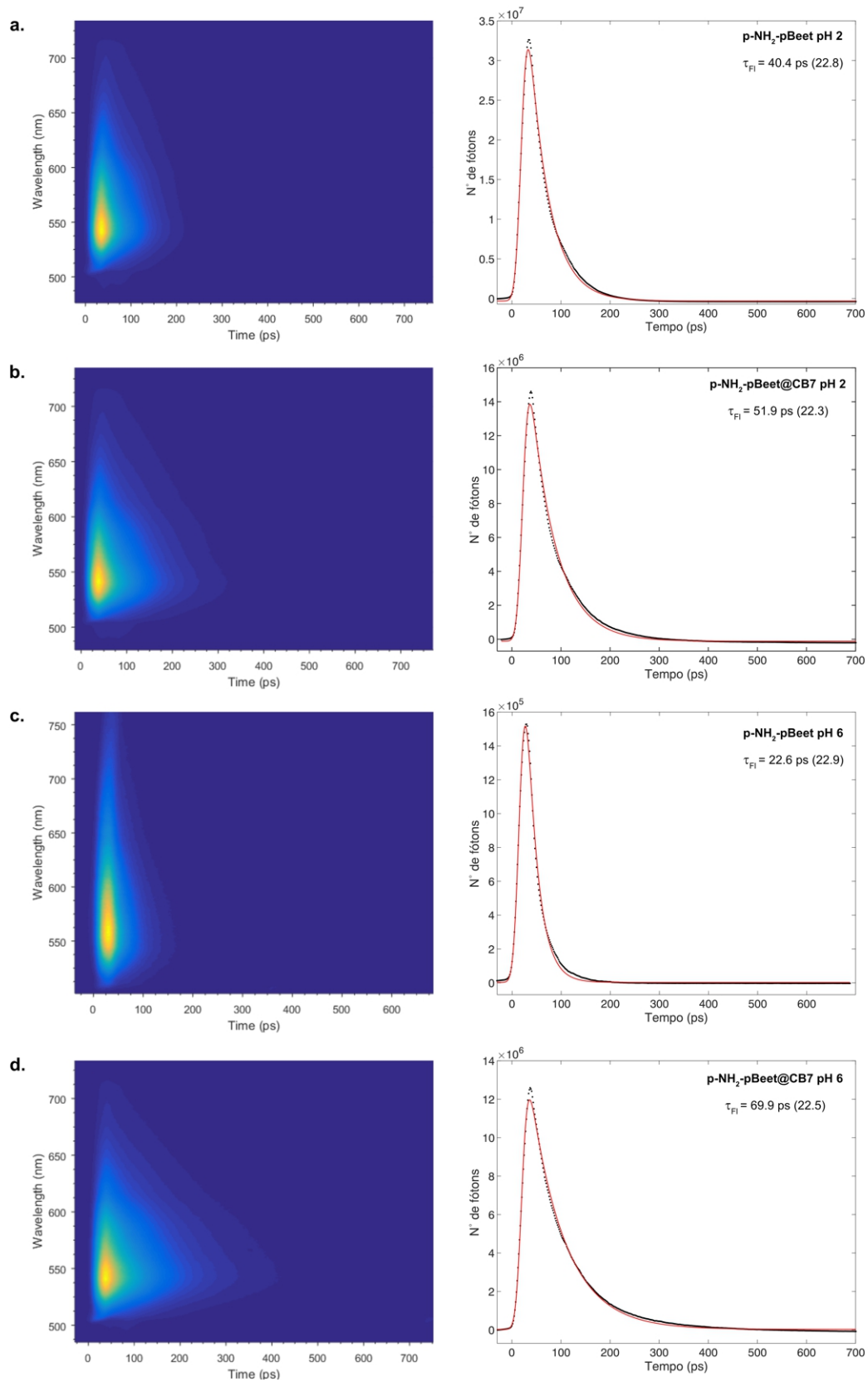


Figura 31. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ detectada por um sistema streak câmara em água (a) pH 2; (b) pH 6; (c) pH 2 na presença de CB7; (d) pH 6 na presença de CB7. $\lambda^{EX} = 500$ nm. O valor entre parênteses é referente ao IRF (*instrument response function*).

Tabela 7. Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{FI}) e tempos de vida de fluorescência (τ_{FI}) da pBeet e da *p*-NH₂-pBeet em meio aquoso, com variação do pH e na ausência ou presença de cucurbit[7]uril (CB7) e resposta do instrumento (IRF), em ps. Excitação dos experimentos em estado estacionário (SS) em 470 nm.

	pBeet			<i>p</i> -NH ₂ -pBeet		
	$\phi_{FI}^{SS}/10^{-3}$	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps	$\phi_{FI}^{SS}/10^{-3}$	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps
TpP, pH 6	2,6 (\pm 0,1)			0,5 (\pm 0,1)		
... + CB7	2,6 (\pm 0,1)			3,2 (\pm 0,2)		
H ₂ O		1,96	18 (22)		0,22	23 (23)
... + CB7		1,50	12 (24)		6,04	70 (22)
	pBeet			<i>p</i> -NH ₃ ⁺ -pBeet		
	$\phi_{FI}^{SS}/10^{-3}$	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps	$\phi_{FI}^{SS}/10^{-3}$	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps
TpC, pH 2	1,6 (\pm 0,1)			5,9 (\pm 0,1)		
... + CB7	1,2 (\pm 0,1)			14 (\pm 1)		
HCl _(aq) , pH 2		1,05	12 (24)		5,87	40 (23)
... + CB7		0,81	10 (25)		11,6	52 (22)

Como todas as betalainas, os tempos de vida de fluorescência estão restritos a poucos picossegundos (ps),^[42] faixa muito próxima da função de resposta do instrumento (do inglês *instrument response function*, IRF). Assim, os valores de τ_{FI} obtidos têm uma incerteza instrumental, mas são certamente menores que a IRF. Os tempos de vida do estado singlete (fluorescência) das betalainas naturais foram determinados por espectroscopia de absorção transiente no grupo do Prof. Burdziński na Polônia. O tempo de vida de fluorescência da *p*-NH₂-pBeet em água ($\tau_{FI} = 23$ ps) é maior do que o de algumas betalainas naturais como a betanina ($\tau_{FI} = 6,8$ ps),^[165] a neobetanina ($\tau_{FI} = 2,3$ ps)^[166] e a miraxantina ($\tau_{FI} = 2,2$ e 20,8 ps),^[167] mas menor do que das betalainas naturais vulgaxantina I ($\tau_{FI} = 2,9$ e 37 ps)^[168] e indicaxantina ($\tau_{FI} = 4,8$ e 27 ps)^[169] e as betalainas semissintéticas derivadas de cumarinas cBeet120 ($\tau_{FI} = 38$ ps)^[42] e cBeet151 ($\tau_{FI} = 100$ ps)^[42]. A miraxantina, a vulgaxantina I e a indicaxantina possuem dois tempos de vida, atribuídos à presença de dois estereoisômeros, entretanto apenas o tempo de vida mais longo é atribuído ao retorno ao estado fundamental por via radiativa (emissão de fluorescência).^[167-169] Devido a resolução do equipamento, não é possível determinar se a *p*-NH₂-pBeet possui menor tempo de vida. A complexação com CB7 torna o tempo de vida de fluorescência da *p*-NH₂-pBeet ($\tau_{FI} = 70$ ps) mais alto do que o da maioria das betalainas na sua forma livre já caracterizadas, com exceção da cBeet151.^[42]

Em meio ácido, o τ_{FI} da $p\text{-NH}_3^+\text{-pBeet}$ ($\tau_F = 40$ ps) é quase o dobro do que em meio neutro ($\tau_F = 23$ ps), sugerindo que há um efeito da protonação completa da betalaína na sua emissão de fluorescência. A CB7 aumenta os tempos de vida de fluorescência da $p\text{-NH}_3^+\text{-pBeet}$ nas duas condições, mas o efeito observado em meio neutro ($\tau_F = 70$ ps, $3\times$ maior) é mais pronunciado do que em meio ácido ($\tau_F = 52$ ps, $1,3\times$ maior). Aumentos do tempo de vida de fluorescência provocados pela CB7 nessa extensão também são observados em estudos de complexos com estequiometria 1:1 com sondas fluorescentes como azul de metileno,^[170] laranja de acridina,^[126] rodamina 6G e 123 e cumarina 102^[171].

A partir do rendimento quântico (ϕ_{FI}) e tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}), é possível calcular as constantes radiativas (k_r) e não-radiativas (k_{nr}) de desativação do estado excitado singlete através das equações 7 e 8. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 8.

$$k_r = \frac{\phi_{FI}}{\tau_{FI}} \quad \text{Eq. 7}$$

$$k_{nr} = \frac{(1 - \phi_{FI})}{\tau_{FI}} \quad \text{Eq. 8}$$

Tabela 8. Rendimento quântico de fluorescência, tempo de vida de fluorescência e constantes radiativas e não-radiativas em meio aquoso.

	$\phi_{FI} / 10^{-3}$	τ_{FI} / ps	k_r / ns^{-1}	k_{nr} / ns^{-1}
pBeet				
H ₂ O	2,0	18	0,11	55,5
... + CB7	1,5	12	0,13	83,2
HCl(aq), pH 2	1,1	12	0,09	83,3
... + CB7	0,8	10	0,08	99,9
p-NH₂-pBeet				
H ₂ O	0,2	23	0,01	43,5
... + CB7	6,0	70	0,09	14,2
HCl(aq), pH 2	5,9	40	0,15	24,9
... + CB7	11,6	52	0,22	19,0

Há um aumento de 15 vezes da constante radiativa provocado pela protonação da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$. A adição de CB7 aumenta a constante radiativa em pH 2 e 6, mas o efeito em meio neutro é maior do que em meio ácido, apesar da constante radiativa na presença de CB7 em pH 2 ser a maior, pois é um efeito combinado entre a protonação e a inclusão. A constante

não-radiativa é maior em meio neutro do que em ácido e a inclusão em CB7 diminui a constante não radiativa nas duas condições, apresentando novamente um efeito é maior em meio neutro do que em ácido. A cucurbit[7]urila é responsável por restringir a liberdade vibracional e conformacional da betalína, inibindo as vias de desativação não radiativa do estado excitado, como já racionalizado para outros hóspedes.^[126,172,173]

Estes dados foram interpretados considerando-se que, em meio ácido, a emissão se origina de um estado LE, enquanto em meio neutro a desativação radiativa por este estado concorre com a formação de um estado de transferência de carga (CT) não emissivo. A inserção em CB7 parece diminuir a tendência de formação do estado CT, possivelmente pela sua desestabilização via favorecimento da protonação do grupo *p*-amino, convertendo seu efeito doador de elétrons em atraente. Além disso, o cruzamento da superfície do estado LE para CT deve exigir alguma relaxação vibracional/conformacional que é limitada na cavidade da CB7. Para testar esta hipótese, foram graficados os espectros de fluorescência resolvidos no tempo para pBeet e *p*-NH₂-pBeet nos dois pHs e na presença e ausência de CB7 (Figura 32). Observa-se que os espectros de emissão são todos muito similares, exceto o espectro resolvido no tempo em 1,6 ps para a *p*-NH₂-pBeet em água, única condição na qual imagina-se que o grupo *p*-amino está totalmente desprotonado e o grupo imino está amplamente desprotonado, permitindo a ocorrência de transferência de carga intramolecular. A deconvolução do espectro releva que nessas condições o ajuste requer uma curva Gaussiana a mais ao redor de 600 nm quando comparado ao requerido para o ajuste do espectro da pBeet (Figura 32).

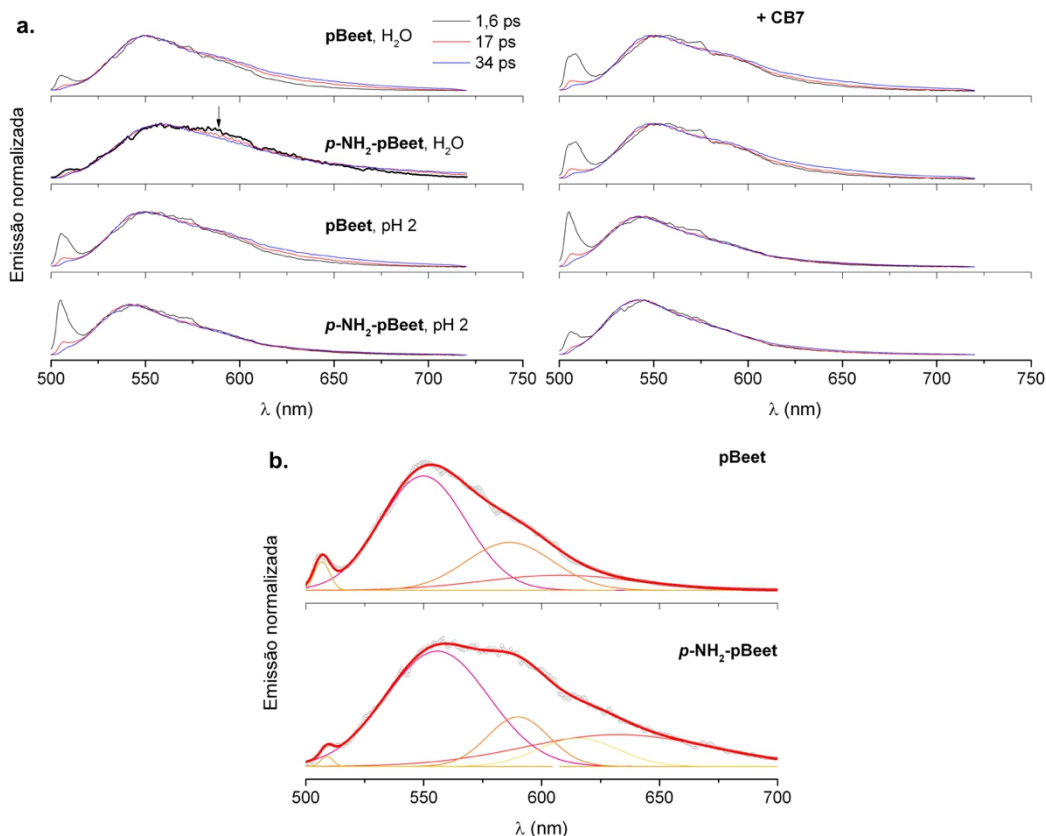


Figura 32. Espectros de fluorescência resolvidos no tempo da pBeet e da *p*-NH₂-pBeet com $\lambda^{\text{EX}} = 500$ nm. (a) Espectros de emissão resolvidos no tempo para pBeet e *p*-NH₂-pBeet em água e em HCl(aq) pH 2. A seta indica o sentido de desaparecimento do ombro. (b) Espectro de emissão resolvido no tempo em 1,6 ps para pBeet e *p*-NH₂-pBeet em água e deconvolução do espectro com curvas Gaussianas. A linha vermelha grossa mostra o ajuste final sobre os pontos pretos experimentais.

2-2.3.2. Absorção transiente

Embora o ombro no espectro de emissão resolvido no tempo suporte a hipótese da existência de um complexo de transferência de carga menos emissivo, a racionalização dos resultados necessita de suporte experimental adicional. Assim, o sistema também foi investigado empregando-se espectroscopia de absorção transiente. pBeet e *p*-NH₂-pBeet foram excitadas (*pump*) em 500 nm e 520 nm, respectivamente, e os espectros de absorção transiente foram obtidos com um feixe de laser de monitoramento (*probe*) gerado usando um cristal de CaF₂. Os experimentos foram realizados na ausência e na presença de CB7 (5 equiv) em solução aquosa neutra ou acidificada com HCl até pH 2. Foi adicionado excesso de cucurbit[7]urila para garantir que o equilíbrio estivesse deslocado completamente no sentido do complexo Bx@CB7. O perfil espectral de absorção transiente da pBeet é apresentado na Figura 33, junto com os decaimentos em função do tempo em comprimentos de onda máximos selecionados.

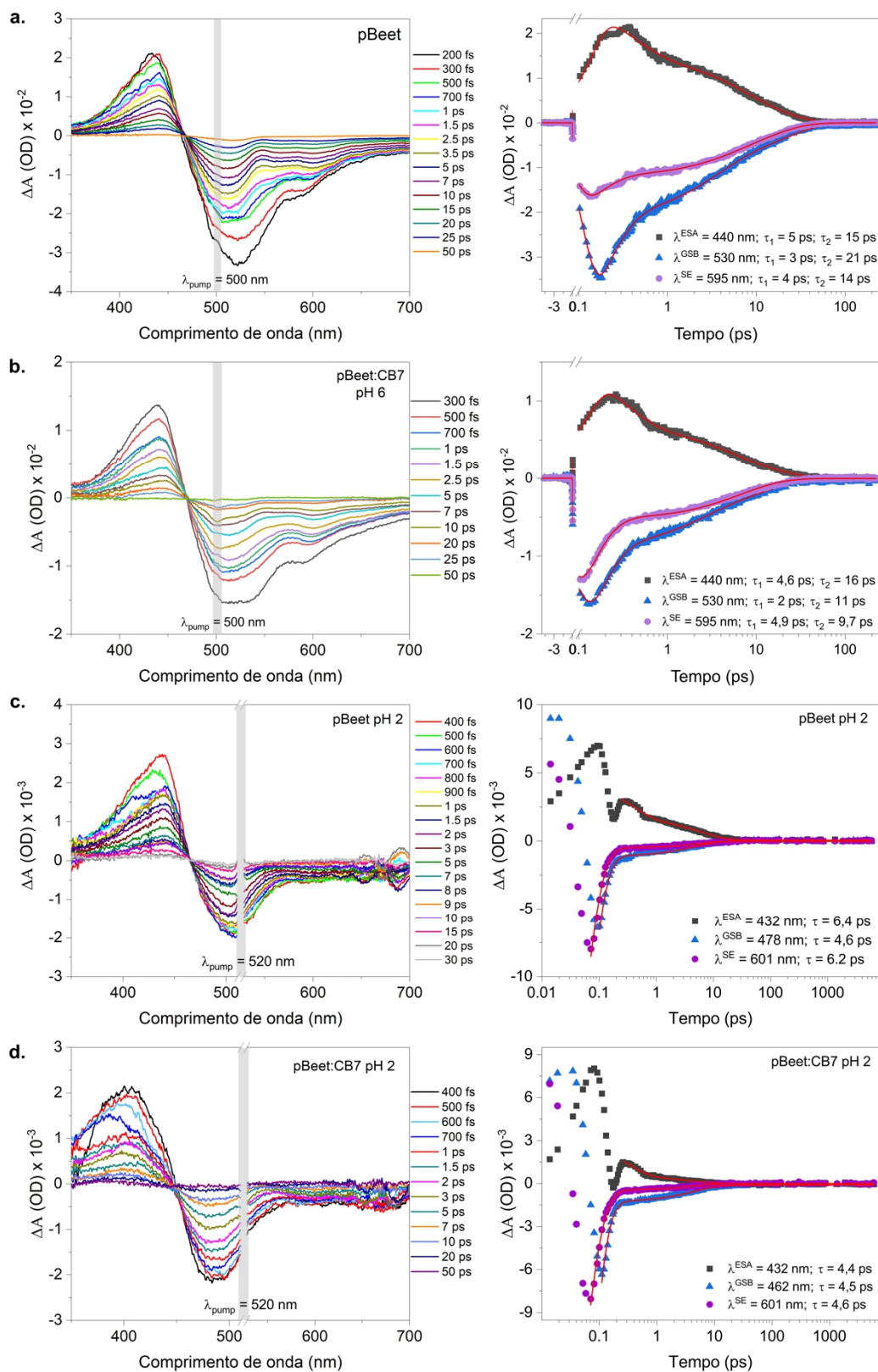


Figura 33. Espectros de absorção transiente em escala de femtosegundos da pBeet em água e em pH 2, na ausência e na presença de CB7 (5 equiv) em atrasos de tempo selecionados $\lambda_{\text{pump}} = 500$ nm.

O perfil espectral da pBeet em água pH 6 (Figura 33a) é similar ao de betalaínas naturais, como a betanina e a miraxantina,^[39,174,175]. O pulso do laser de excitação (*pump*) popula o estado excitado da betalaína e o laser de monitoramento (*probe*) excita as espécies transientes formadas, permitindo seguir a evolução temporal das espécies nos estados fundamental e excitado através da aquisição de espectros que apresentam a diferença da absorção (ΔA , de forma simplificada $A_{t>0} - A_{t<0}$, onde $t = 0$ é o instante do *pump*) em função do comprimento de onda do *probe* (λ) ao longo de intervalos definidos de tempo entre os pulsos (Δt). Após a excitação inicial, o pulso *probe* tem pelo menos três consequências que fazem parte do sinal de ΔA : (i) a população de estados excitados superiores acompanhada por um sinal transiente positivo (ESA, *excited-state absorption*, $S_1 \rightarrow S_n$, com $n > 1$, $A_{t>0} > A_{t<0}$), (ii) a emissão estimulada induzida pela interação dos fótons do feixe *probe* com as espécies excitadas, o que leva ao aumento da intensidade de luz na faixa de emissão após o pulso e é, portanto, acompanhado por um sinal negativo de ΔA que coincide – de forma geral – com o perfil do espectro de fluorescência do corante (SE, *stimulated emission*, $S_1 \rightarrow S_0$) e (iii) a redução da população no estado fundamental após o pulso, que resulta em um sinal transiente negativo chamado de branqueamento do estado fundamental (GSB, *ground state bleaching*, $S_0 \rightarrow S_1$, $A_{t<0} > A_{t>0}$).

Em água, três sinais de ΔA da *probe* são observadas após a excitação da pBeet em 500 nm: ΔA negativa com máximo ao redor de 520 nm referente ao GSB da pBeet, ΔA negativa com máximo próximo a 590 nm, correspondente à emissão estimulada, e ΔA positiva centrada em $\lambda_{\max} = 440$ nm correspondente à absorção do estado excitado. A ausência de bandas positivas atribuídas a espécies transientes, a existência de um ponto isobéstico em 467 nm e o curto tempo de retorno do estado excitado para o fundamental (< 100 ps) sugere que os eventos observados para pBeet são apenas a resposta fotofísica à excitação com o laser em 500 nm e não há evidência de cruzamento intersistemas (ISC) ou de processos fotoquímicos.^[176,177]

As bandas observadas se mantêm as mesmas ao longo do tempo de monitoramento, mas há pequenos deslocamentos dos máximos de ΔA para λ s mais longos (menor energia) na escala de tempo de 1 ps ocasionados pela relaxação do solvente. Após a excitação, as moléculas de betalaína são excitadas para um estado excitado não-relaxado denominado estado de *Franck-Condon*, ou estado localmente excitado (LE). As moléculas do solvente precisam se reorientar em torno do momento de dipolo do estado excitado, que é diferente do momento de dipolo do estado fundamental, o que ocorre numa velocidade de relaxação mais lenta do que o processo vertical de excitação, provocando deslocamentos no espectro durante esse processo.^[178,179]

Foram selecionados comprimentos de onda representativos de cada uma das bandas observadas nos espectros de absorção transiente e os tempos de vida (τ) correspondentes foram calculados por meio de ajuste não linear usando uma função exponencial, como implementado no programa Surface Xplorer (Figura 33a, Tabela 9). O IRF desse sistema é menor que 150 fs, assim tempos de vida nessa faixa não serão consideradas na discussão dos dados. A análise global permite, entre outras coisas, resolver os espectros de absorção transiente em função do tempo e foi realizada utilizando o software Glotaran (Tabela 9), que ajusta simultaneamente todos os comprimentos de onda do espectro.^[180]

Para pBeet em água foram determinados dois tempos de vida $\tau_1 = 3,1$ ps e $\tau_2 = 21$ ps, a partir do ajuste na banda de branqueamento no estado fundamental (530 nm). A formação do complexo pBeet@CB7 pela adição de 5 equiv de CB7 à solução aquosa não provoca mudanças no perfil do espectro de absorção transiente (Figura 33b). Em pH 2, a principal mudança nos espectros de absorção transiente é a diminuição considerável da contribuição da banda de emissão estimulada em relação à pBeet em meio neutro. A adição de CB7 alarga a banda de absorção do estado excitado e desloca o comprimento de onda máximo de 440 nm para 404 nm. A banda de branqueamento do estado fundamental também se desloca para comprimentos de onda mais curtos (de 503 nm para 487 nm). Comportamento similar também é observado no estado estacionário, em que o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção varia de 504 nm para 497 nm.

Tabela 9. Constantes de tempo de absorção transiente da pBeet em diferentes condições em água e pH 2, na ausência e na presença de cucurbit[7]urila (CB7). ESA (absorção no estado excitado), GSB (branqueamento), SE (emissão estimulada).

pBeet (H ₂ O)					pBeet (pH 2)		
	IRF	τ	τ_1	τ_2		τ_1	τ_2
ESA, 440 nm	125 fs	375 fs	5,1 ps	15,1 ps	ESA, 432 nm	355 fs	6,4 ps
GSB, 530 nm	79 fs	146 fs	3,1 ps	20,9 ps	GSB, 478 nm	46 fs	4,6 ps
SE, 595 nm	70 fs	111 fs	4,2 ps	13,9 ps	SE, 601 nm	38 fs	6,2 ps
Análise Global	133 fs	286 ps	3,1 ps	14,6 ps	Análise Global	132 fs	4,9 ps
pBeet@CB7 (H ₂ O)					pBeet@CB7 (pH 2)		
	IRF	τ	τ_1	τ_2		τ_1	τ_2
ESA, 440 nm	132 fs	282 fs	4,6 ps	16,3 ps	ESA, 432 nm	272 fs	4,4 ps
GSB, 530 nm	87 fs	107 fs	2,0 ps	11,0 ps	GSB, 462 nm	39 fs	4,5 ps
SE, 595 nm	68 fs	82 fs	4,9 ps	9,7 ps	SE, 601 nm	40 fs	4,6 ps
Análise Global	104 fs	255 fs	3,3 ps	14,2 ps	Análise Global	64 fs	3,8 ps

Para as medidas em meio ácido não houve convergência dos ajustes usando o Surface Explorer possivelmente pela complexidade dos espectros com tempo de monitoramento inferior a 400 fs. Por isso, os ajustes foram feitos com o programa Origin (OriginLab) que, após convergência, determinou um tempo de vida em torno de 6 ps para pBeet e 4,5 ps para pBeet@CB7 em pH 2 (Tabela 9). Considerando que os tempos de vida dos estados singlete dessas espécies foram determinados e são próximos a 10 ps (Tabela 8), os dados obtidos parecem indicar que a via de desativação não radiativa é extremamente rápida para a pBeet em meio ácido.

Os experimentos de absorção transiente foram repetidos para a *p*-NH₂-pBeet nas mesmas condições experimentais da pBeet. Após a excitação da *p*-NH₂-pBeet em água em 520 nm (Figura 34a), observa-se uma banda com ΔA positiva em 442 nm correspondente à absorção do estado excitado e outra banda com ΔA negativa em 530 nm correspondente ao branqueamento do estado fundamental. É perceptível o deslocamento da banda de ESA para 445 nm e do GSB para 520 nm em cerca de 1,5 ps, como resultado da relaxação do solvente. Diferentemente da pBeet, existem dois pontos isobésticos entre a banda de ESA e GSB: (i) em 492 nm, que corresponde aos primeiros 2,5 ps após a excitação; (ii) em 474 nm acompanhando o restante dos processos. A existência de dois pontos isobésticos e a existência de uma nova banda de absorção do estado excitado na mesma região esperada para a banda de emissão estimulada indica a existência de pelo menos uma espécie transiente (Figura 34a). Os valores de $\tau_2 = 2,0$ ps e $\tau_3 = 19,8$ ps medidos em 535 nm (branqueamento do estado fundamental) são similares às constantes de tempo determinadas com o ajuste na banda de absorção do estado excitado em 442 nm (Figura 34a, Tabela 10). Após a adição de 5 equiv. de CB7 as bandas de ESA e GSB ainda estão presentes, mas é possível notar pequenas alterações no seu perfil (Figura 34b). A banda de absorção do estado excitado em 437 nm é larga e similar à da *p*-NH₂-pBeet nos primeiros femtosegundos, mas após cerca de 1,5 ps torna-se mais fina, com máximo em 440 nm. Novamente, dois pontos isobésticos são observados em 496 nm (nos primeiros 3 ps) e 466 nm (no restante da evolução temporal). Adicionalmente, a banda de absorção positiva em 640 nm é mais evidente do que na forma livre da betalaína. Na presença de CB7, τ_2 aumenta muito pouco ($\tau_2 = 2,7$ ps), mas τ_3 triplica ($\tau_3 = 59,7$ ps).

O perfil espectral da *p*-NH₂-pBeet em pH 2 é similar ao da pBeet em meio aquoso neutro (Figura 34c). O branqueamento do estado fundamental em 535 nm possui $\tau_1 = 1,7$ ps e $\tau_2 = 20,6$ ps. As constantes de tempo de branqueamento do estado fundamental, emissão estimulada e absorção no estado excitado são de aproximadamente 21 ps (Tabela 10). A adição de 5 equiv.

de CB7 não altera o perfil espectral dos espectros de absorção transiente de *p*-NH₂-pBeet, mas aumenta τ_2 para 41,8 ps.

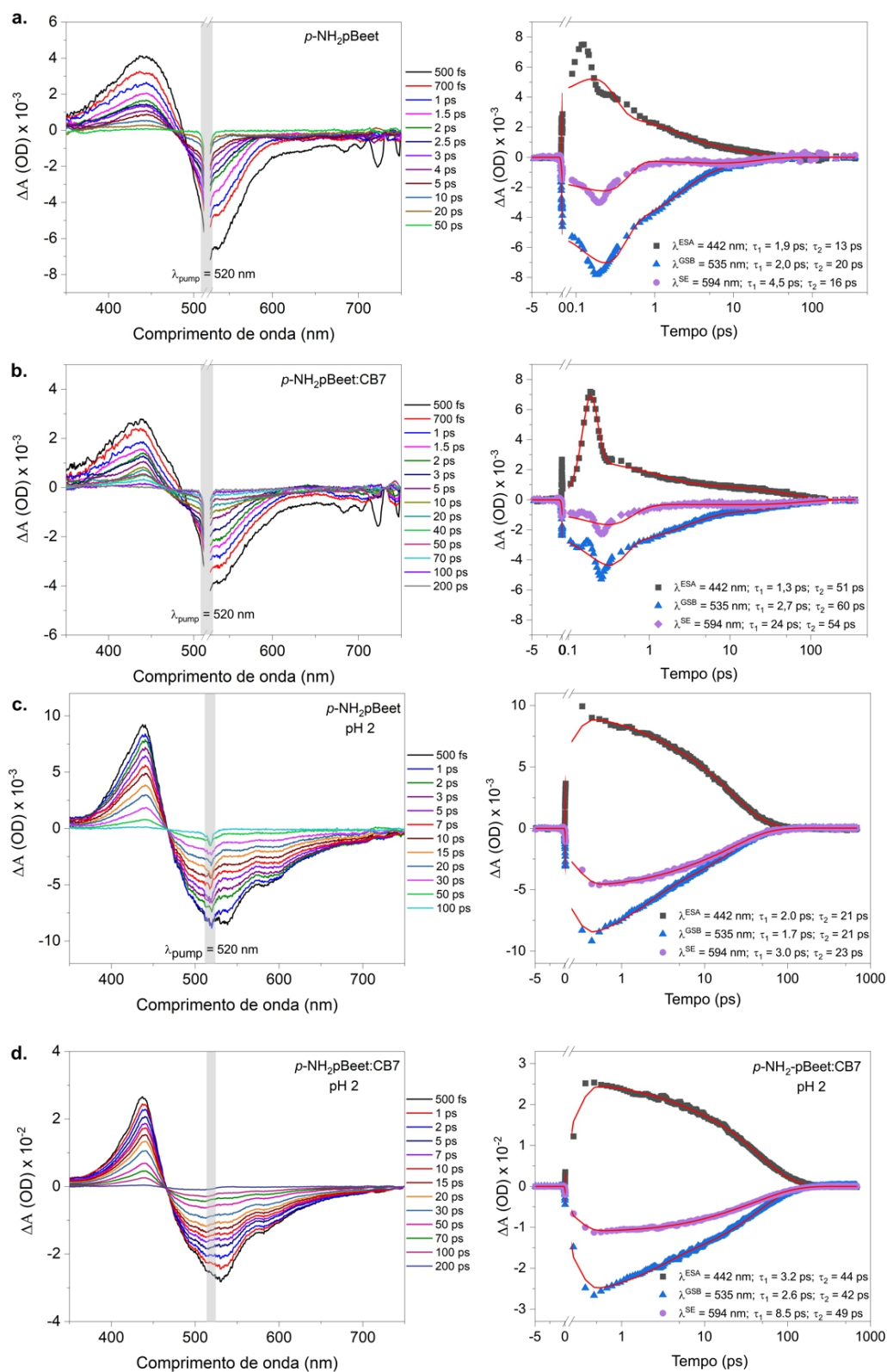


Figura 34. Espectros de absorção transiente em escala de femtosegundos da *p*-NH₂-pBeet em água pH 2 e pH 6, na ausência e na presença de CB7 (5 equiv.). $\lambda_{pump} = 520$ nm

Tabela 10. Constantes de tempo de absorção transiente da *p*-NH₂-pBeet em diferentes condições em água e pH 2, na ausência e na presença de cucurbit[7]urila (CB7). ESA (absorção no estado excitado), GSB (branqueamento), SE (emissão estimulada).

<i>p</i> -NH ₂ -pBeet (H ₂ O)					<i>p</i> -NH ₂ -pBeet (pH 2)			
	IRF	τ	τ_1	τ_2		IRF	τ_1	τ_2
ESA, 442 nm	267 fs	53 fs	1.9 ps	13.4 ps	ESA, 442 nm	250 fs	2.0 ps	21.4 ps
GSB, 535 nm	349 fs	70 fs	2.0 ps	19.8 ps	GSB, 535 nm	246 fs	1.7 ps	20.6 ps
SE, 594 nm	396 fs	79 fs	4.5 ps	15.7 ps	SE, 594 nm	264 fs	3.0 ps	23.5 ps
Análise Global	97 fs	224 fs	1.7 ps	16.7 ps	Análise Global	177 fs	2.0 ps	22.2 ps
<i>p</i> -NH ₂ -pBeet@CB7 (H ₂ O)					<i>p</i> -NH ₂ -pBeet@CB7 (pH 2)			
	IRF	τ	τ_1	τ_2		IRF	τ_1	τ_2
ESA, 442 nm	72 fs	26 fs	1.3 ps	51.2 ps	ESA, 442 nm	240 fs	3.2 ps	44.4 ps
GSB, 535 nm	376 fs	75 fs	2.7 ps	59.7 ps	GSB, 535 nm	248 fs	2.6 ps	41.8 ps
SE, 594 nm	384 fs	275 fs	24 ps	54.4 ps	SE, 594 nm	265 fs	8.5 ps	49.4 ps
Análise Global	177 fs	376 fs	2.9 ps	70.2 ps	Análise Global	201 fs	3.8 ps	46.3 ps

Apesar da grande diferença no perfil espectral da *p*-NH₂-pBeet em meio ácido ou neutro, os tempos de vida são similares. A formação dos complexos de inclusão com CB7 não provoca alterações importantes no perfil do espectro de absorção transiente, mas em meio neutro (betalaína completamente protonada) a CB7 triplica o tempo de vida mais longo do estado excitado. Em meio ácido (betalaína completamente protonada), a amplitude do efeito da CB7 é menor, apenas duplicando os tempos de vida. Esse comportamento não foi observado com a pBeet, na qual a CB7 provoca pequena influência nos tempos de vida do estado excitado da pBeet, sugerindo que há uma grande influência do grupo amino na complexação e em como a fotofísica do estado excitado das betalaínas é afetada. Os perfis espectrais da *p*-NH₂-pBeet em meio ácido são similares aos da pBeet em meio neutro.

Como resposta da análise global, obtemos os espectros de decaimento associado (DAS), associados às constantes de tempo de vida (Figura 35). O DAS permite distinguir como os espectros resolvidos no tempo e suas amplitudes se alteram ao longo do tempo, em conjunto com principais mudanças espectrais, o que contribui para a seleção de um modelo cinético que descreva os processos fotofísicos no estado excitado do sistema.^[181,182]

O espectro DAS da pBeet em água da espécie com tempo de vida $\tau_2 = 3,1$ ps está associado a evolução da banda de absorção do estado excitado em 440 nm e do branqueamento do estado fundamental em 550 nm com pequena contribuição da banda de emissão estimulada

em 600 nm. A constante de tempo de vida $\tau_3 = 14,6$ ps também contém a evolução dessas três bandas, mas podemos observar o deslocamento da banda de absorção do estado excitado para 450 nm e do branqueamento do estado fundamental para 500 nm, além da contribuição muito mais pronunciada da banda de emissão estimulada em torno de 610 nm. A maior amplitude da banda de emissão estimulada no espectro de DAS associado com $\tau_3 = 14,6$ ps sugere que essa constante de tempo está associada à volta para o estado fundamental pela via radiativa. A complexação com CB7 aumenta a amplitude da banda de emissão estimulada da pBeet em 600 nm associada à $\tau = 3,3$ ps, aproximando-se da amplitude da mesma banda associada com o tempo de vida mais longo ($\tau = 14,2$ ps).

A análise global dos dados da *p*-NH₂-pBeet em meio aquoso neutro também foi realizada utilizando três tempos de vida. O menor tempo de vida, $\tau_2 = 1,7$ ps, está associado ao decaimento da banda de absorção do estado excitado em 450 nm, ao branqueamento do estado fundamental em 530 nm e a uma segunda banda de absorção do estado excitado em 620 nm (Figura 35a). Enquanto no espectro global a segunda banda de absorção do estado excitado é mais sutil, a análise global separa a sua contribuição temporal, deixando a sua existência evidente. A constante de tempo de vida mais longa ($\tau_3 = 17$ ps), está associada à absorção do estado excitado em 450 nm, uma pequena contribuição do branqueamento do estado fundamental em 520 nm e uma banda de emissão estimulada em 625 nm.

Em meio ácido, apenas duas constantes de tempo foram utilizadas para ajustar os espectros de absorção transiente pela análise global. Os tempos de vida determinados para *p*-NH₃⁺-pBeet são próximos aos obtidos com o ajuste em meio neutro; entretanto, os perfis dos espectros de decaimento associado são diferentes. O $\tau_1 = 2,0$ ps está associado a banda de ESA em 440 nm, uma banda de GSB em 545 nm e de SE em 600-650 nm. O espectro de decaimento associado à constante de tempo de vida mais longa ($\tau_2 = 22,2$ ps) também está associado à evolução dessas três bandas, mas a banda de ESA está deslocada para 450 nm, enquanto a banda de GBS desloca-se para energias mais altas (515 nm). Novamente, a banda de emissão estimulada tem maior contribuição associada a constante de tempo mais longo.

A inclusão em cucurbiturila não afeta de forma expressiva o perfil dos espectros de decaimento associado (DAS), mas os tempos de vida são o dobro em relação à *p*-NH₂-pBeet livre (Figura 35, Tabela 10). Em água, o efeito da CB7 é mais expressivo no tempo de vida mais longo ($\tau_3 = 70,2$ ps), que está associado à uma banda de absorção do estado excitado em 450 nm e possui perfil espectral mais fino do que o da constante de tempo menor e do que a sua correspondente temporal. Adicionalmente, a banda de branqueamento em 520 nm e a banda

de emissão estimulada em 600 nm estão levemente deslocadas para menor comprimento de onda em relação à betalaína livre. Isso sugere que a cucurbiturila possui maior influência sobre o que é responsável por esse tempo de vida do que da espécie responsável por τ_2 . Comparativamente, pBeet não possui a primeira constante de tempo associada ao surgimento de uma segunda banda de absorção do estado excitado.

Em resumo, em todos os casos os espectros mostram a absorção do estado excitado e o branqueamento do estado fundamental acompanhados pelos deslocamentos das bandas causados pela relaxação do solvente (Figura 35). Contudo, observa-se uma banda positiva intensa somente para *p*-NH₂-pBeet na ausência de CB7 que se torna menos intensa em relação às outras bandas do espectro na presença do macrociclo. Essa banda positiva corresponde a uma espécie transiente com tempo de vida de aproximadamente 2 ps e que corrobora os dados de emissão resolvida no tempo para a existência da betaxantina no estado CT cuja população requer o grupo amino desprotonado. Na presença de CB7, os efeitos de aumento de pK_a aumentam a proporção *p*-NH₃⁺-pBeet/*p*-NH₂-pBeet e impõe restrição vibracional e/ou conformacional às betalaínas resultando em aumento da fluorescência. Com CB7 observa-se uma diminuição da banda correspondente à espécie transiente no estado CT não emissivo. Em meio neutro na presença e ausência de CB7 há o desaparecimento do sinal positivo ao redor de 610 nm.

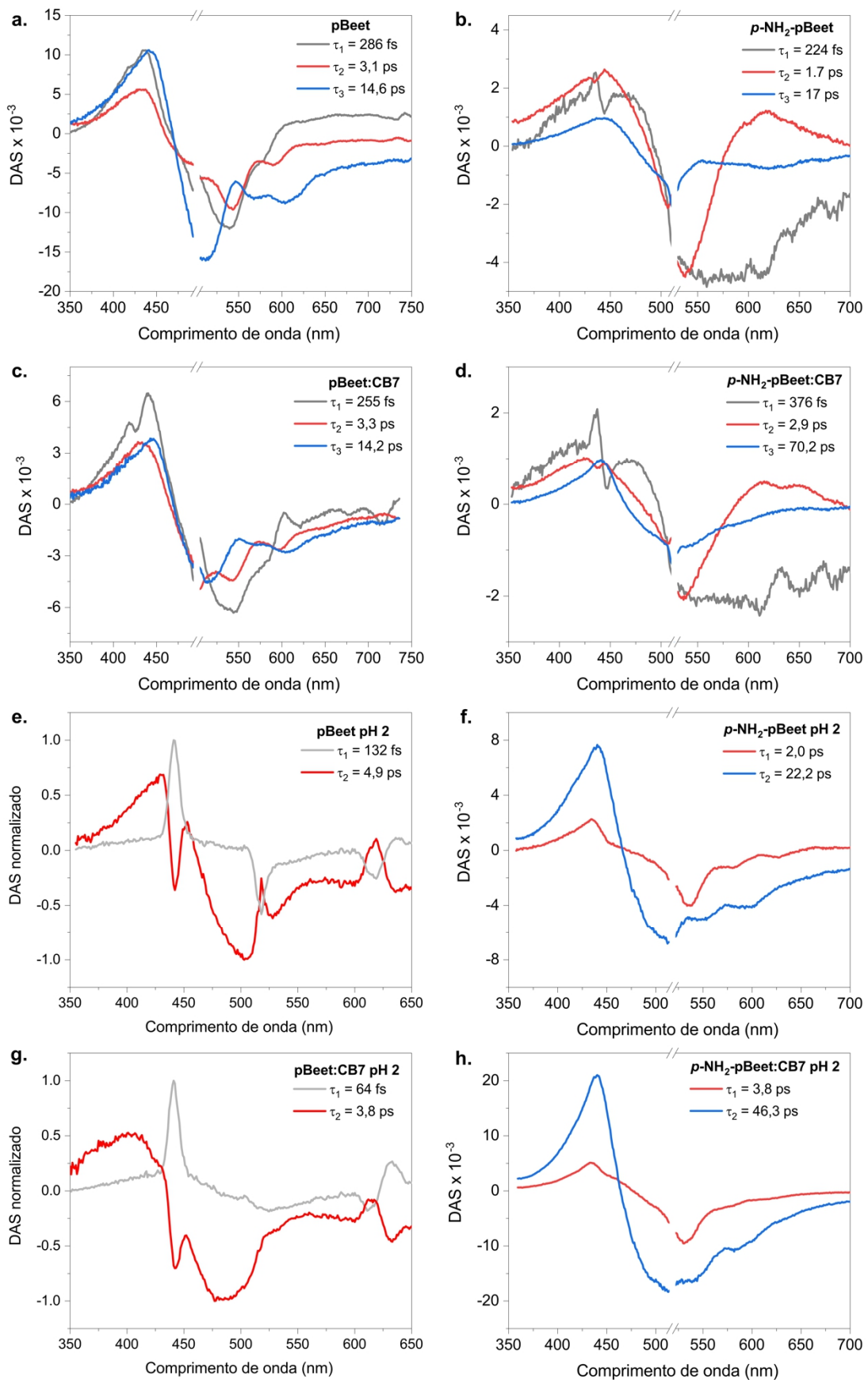


Figura 35. Espectros de decaimento associado (DAS) e os respectivos decaimentos temporais ajustados com três exponenciais com o software Glotaran.

A Figura 36 sistematiza os resultados até esse ponto. Em meio ácido, as betaxantinas totalmente protonadas emitem fluorescência com rendimento quântico na faixa de 0,5%, valor 3 vezes maior comparado a meio neutro, condição na qual os grupos carboxílicos e *p*-amino estão desprotonados. A presença de grupos doadores de elétrons (EDG) conjugados ao sistema 1,7-diaza-heptametínio estabiliza estados de transferência de carga (CT) não emissivos que podem ser populados a partir do estado localmente excitado (LE). Dessa forma, quando há uma inversão de polaridade da *p*-NH₂-pBeet pela protonação do grupo *p*-amino, o estado CT é desfavorecido aumentando a fluorescência e reduzindo o perfil de absorção transiente aos processos fotofísicos de absorção do estado excitado, branqueamento do estado fundamental e emissão estimulada. A complexação com CB7 favorece a formação de complexos 2:1 que tendem a aumentar o p*K*_{aH} do grupo *p*-amino, favorecendo o aumento da proporção de *p*-NH₃⁺-pBeet e aumentando a fluorescência. O estado CT é minimamente emissivo e foi possível observá-lo para o composto *p*-NH₂-pBeet em meio aquoso neutro por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo e absorção transiente. A complexação com CB7 desloca o equilíbrio em direção ao estado LE e restringe a desativação térmica do estado, favorecendo a fluorescência. Embora esses compostos sejam pouco fluorescentes, o entendimento obtido aqui permite desenvolver derivados mais fluorescentes, além de representar um exemplo de espécie multifuncional cujo comportamento no estado excitado pode ser controlado.

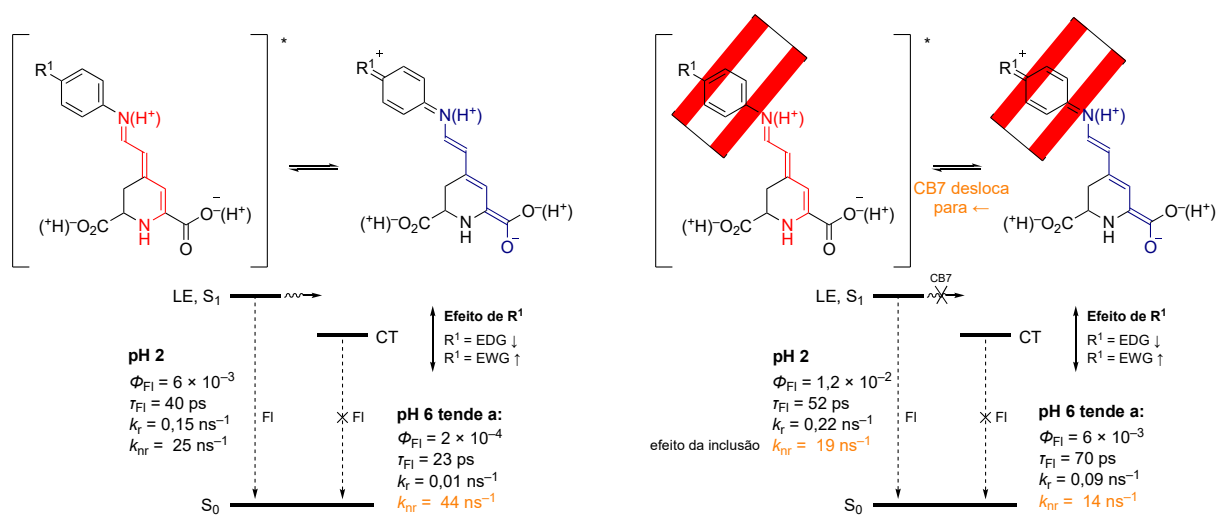


Figura 36. Proposta mecânica para o efeito do pH e da complexação com CB7 sobre as propriedades de pBeet e *p*-NH₂-pBeet no estado excitado.

Para caracterizar de forma definitiva a natureza do papel da transferência de carga no estado excitado, foi investigado o efeito da viscosidade do meio sobre as propriedades fotofísicas dos complexos Bx@CB7. Viscosidade é um parâmetro que na sua forma macroscópica reflete resistência ao escoamento, mas que sob o ponto de vista microscópico se refere a interações que resultam em restrição vibracional, conformacional e difusional.^[183,184] Dada a natureza aquosa do sistema, glicerol foi usado como agente viscosogênico. Embora essa mistura não mantenha a polaridade do sistema constante com o aumento da fração molar (χ) de glicerol, espera-se que a mudança da viscosidade influencie a dinâmica do sistema.

Foram preparadas duas misturas de glicerol/água (Gli/H₂O) com 25% e 75% (m/m) de Gli em H₂O. As medidas foram realizadas em meio neutro ou acidificado com HCl ($[HCl]_{\text{final}} = 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}_{\text{app}} 2$), na ausência e presença de CB7 (5 equiv). Os espectros de absorção e emissão da pBeet e *p*-NH₂-pBeet nas duas condições de mistura são apresentados na Figura 37. O perfil espectral da pBeet nas misturas é similar ao existente em água, mas observa-se um pequeno deslocamento batocrômico no máximo de absorção da pBeet com o aumento da fração de glicerol da mistura (507 nm em H₂O, 509 nm em 25% Gli/H₂O, 511 nm em 75% Gli/H₂O). O comprimento de onda máximo (λ_{max}) de emissão não é afetado pelo aumento da fração molar de glicerol na mistura, mas a intensidade de fluorescência aumenta. A presença de glicerol no meio também provoca um deslocamento batocrômico do λ_{max} de absorção da *p*-NH₂-pBeet (520 nm em H₂O, 525 nm em 25% Gli/H₂O, 522 nm em 75% Gli/H₂O).

O aumento da concentração de glicerol na mistura de solvente em meio neutro aumenta o ϕ_{FI} das duas betalainas (Tabela 11). Em 25% Gli/H₂O, o aumento do ϕ_{FI} em relação a água é similar para ambas as betalainas (1,6×). Quando a proporção de glicerol é aumentada para 75% (m/m), o aumento do ϕ_{FI} é muito maior para a *p*-NH₂-pBeet do que para a pBeet, possivelmente por causa do efeito da diminuição da polaridade do meio sobre as propriedades eletrônicas do grupo *p*-amino que, entre outros efeitos, aumentam a sua basicidade.^[185]

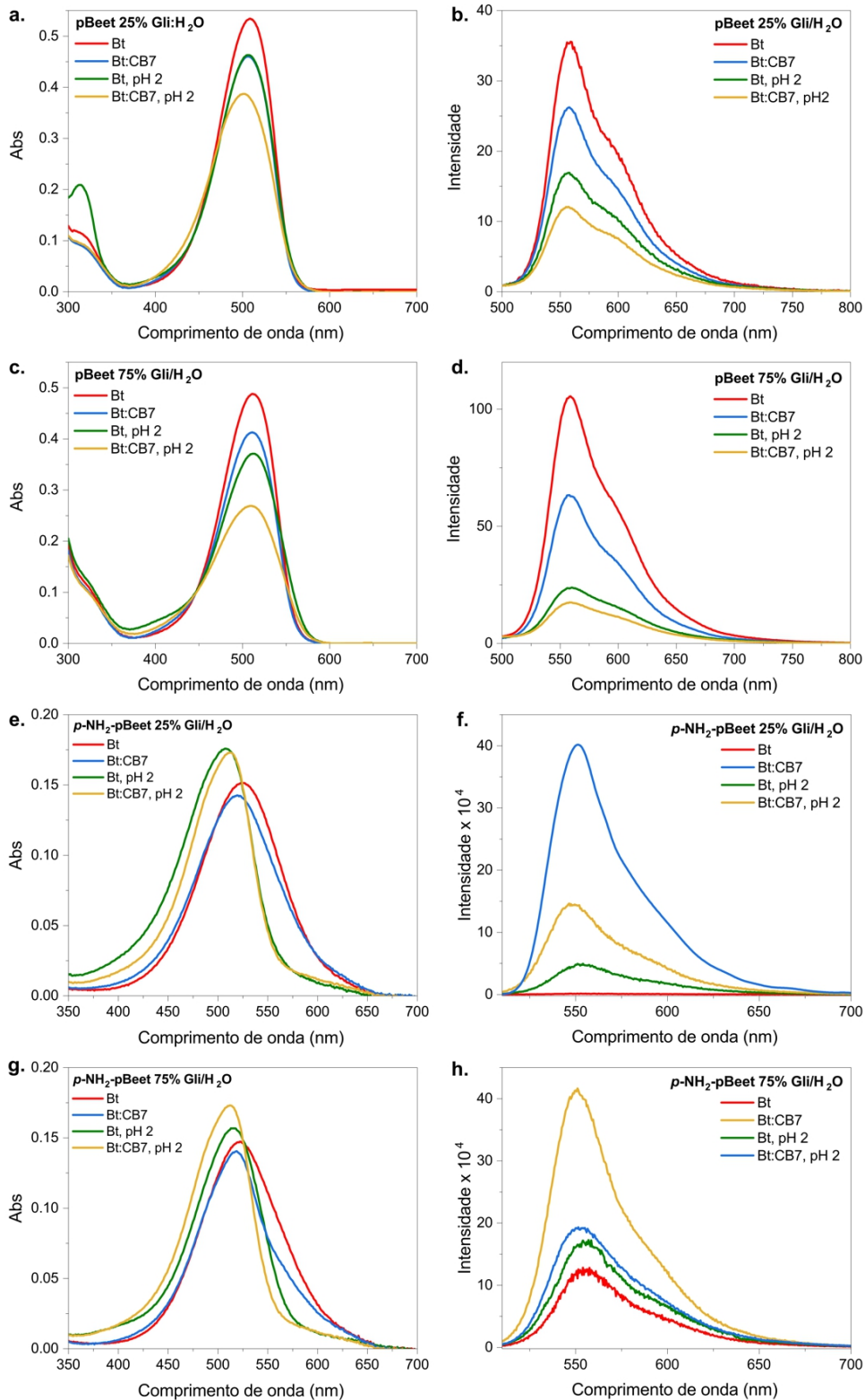


Figura 37. Efeito do glicerol, pH e CB7 sobre os espectros de absorção e emissão. (a), (b) pBeet em misturas de 25% Gli/H₂O^(m/m), ($\lambda_{exc} = 470$ nm); (c), (d) pBeet em 75% Gli/H₂O^(m/m), ($\lambda_{exc} = 470$ nm); (e), (f) p-NH₂-pBeet em 25% Gli/H₂O^(m/m), ($\lambda_{exc} = 490$ nm); (g), (h) p-NH₂-pBeet em 75% Gli/H₂O^(m/m), ($\lambda_{exc} = 490$ nm).

CB7 não altera o efeito do glicerol sobre a fluorescência da pBeet em relação aos resultados obtidos na sua ausência e, assim como ocorre em meio aquoso, a inclusão de pBeet em CB7 inibe a sua fluorescência, independentemente da concentração de glicerol na mistura de solventes. Ao contrário, a inclusão da *p*-NH₂-pBeet em CB7 aumenta consideravelmente a fluorescência, comportamento que é mantido em água e em misturas glicerol/água. O ϕ_{FI} da *p*-NH₂-pBeet@CB7 em 25% Gli/H₂O é 10 vezes maior do que em água, um efeito maior do que o observado na ausência de CB7. O aumento da proporção de glicerol para 75% Gli/H₂O não aumenta muito mais o ϕ_{FI} comparado a 25% Gli/H₂O, resultado que difere do observado na ausência de CB7. O aumento do ϕ_{FI} da *p*-NH₂-pBeet provocado pela CB7 é maior em 25% Gli/H₂O, mas não é linear, o que parece indicar que há um aumento máximo possível de ϕ_{FI} provocado pela combinação CB7/glicerol. A magnitude dos efeitos provocados pelo aumento da fração de glicerol sobre a pBeet e seu complexo pBeet@CB7 em meio ácido é similar ao observado em meio neutro, mas o ϕ_{FI} da pBeet em meio ácido é menor do que em meio neutro, possivelmente devido à rápida hidrólise da betalaína nessas condições.

Os tempos de vida de fluorescência nas misturas de Gli/H₂O e as constantes de decaimento radiativo e não-radiativo são apresentados na Tabela 11 e os dados brutos nos Anexos 23 e 24. Como esperado considerando-se os dados de ϕ_{FI} , o aumento da viscosidade do meio resulta em um aumento dos tempos de vida de fluorescência de ambas as betalaínas. Na pBeet e na *p*-NH₂-pBeet em meio ácido e neutro, o aumento da viscosidade do meio altera principalmente a constante não radiativa, que diminui com o aumento da fração do glicerol. Na pBeet, assim como acontece em meio aquoso, a formação do complexo com cucurbiturila aumenta a constante não radiativa, apesar de não provocar grandes mudanças na constante radiativa. Já para o complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7, o aumento da fração de glicerol resulta também em um aumento da constante radiativa. Em 75% Gli/H₂O, a adição de CB7 não diminui mais a constante não-radiativa, influenciando apenas k_r .

Tabela 11. Rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{FI}), tempo de vida de fluorescência (τ_{FI}) e constantes radiativa (k_r) e não-radiativa (k_{nr}) da pBeet e da *p*-NH₂-pBeet em diferentes condições de meio.

pBeet	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps	k_r/ns^{-1}	k_{nr}/ns^{-1}
H ₂ O	2,0	18	0,11	55,5
H ₂ O + CB7	1,5	12	0,13	83,2
HCl(aq), pH 2	1,1	12	0,09	83,3
HCl(aq), pH 2 + CB7	0,8	10	0,08	99,9
25% Gli/H ₂ O	3,1	25 (23)	0,12	39,9
25% Gli/H ₂ O + CB7	2,5	21 (22)	0,12	47,5
25% Gli/H ₂ O, pH 2	1,7	16 (25)	0,11	62,4
25% Gli/H ₂ O, pH 2 + CB7	1,2	11 (24)	0,11	90,8
75% Gli/H ₂ O	12	115 (59)	0,10	8,6
75% Gli/H ₂ O + CB7	8,1	128 (57)	0,06	7,8
75% Gli/H ₂ O, pH 2	3,9	89 (50) ^a	0,04	11
75% Gli/H ₂ O, pH 2 + CB7	3,3	89 (49) ^a	0,04	11

<i>p</i>-NH₂-pBeet	$\phi_{FI}/10^{-3}$	τ_{FI} (IRF) /ps	k_r/ns^{-1}	k_{nr}/ns^{-1}
H ₂ O	0,2	23	0,01	44
H ₂ O + CB7	6,0	70	0,09	14
HCl(aq), pH 2	5,9	40	0,15	25
HCl(aq), pH 2 + CB7	12	52	0,22	19
25% Gli/H ₂ O	0,4	71 (21)	0,01	14
25% Gli/H ₂ O + CB7	61	111 (57)	0,55	8,4
25% Gli/H ₂ O, pH 2	5,6	46 (22)	0,12	21
25% Gli/H ₂ O, pH 2 + CB7	17	75 (43)	0,23	13
75% Gli/H ₂ O	24	290 (60)	0,08	3,4
75% Gli/H ₂ O + CB7	75	280 (50)	0,27	3,3
75% Gli/H ₂ O, pH 2	28	150 (60) ^b	0,19	9,5
75% Gli/H ₂ O, pH 2 + CB7	28	164 (60) ^c	0,17	5,9

^a O ajuste foi realizado com 2 constantes de tempo, $\tau_2 = 20$ ps.

^b Média ponderada, o ajuste foi realizado com 2 constantes de tempo, $\tau_1 = 209$ ps, $\tau_2 = 80$ ps.

^c Média ponderada, o ajuste foi realizado com 2 constantes de tempo, $\tau_1 = 260$ ps, $\tau_2 = 89$ ps.

O aumento da viscosidade resulta em pequenas alterações nos espectros de absorção transiente da pBeet (Figura 38 e 39, Tabela 12). Em misturas de 25% Gli/H₂O, o perfil espectral ainda é semelhante ao da água pura, embora as constantes de tempo aumentem proporcionalmente. Na presença de CB7, os espectros de absorção transiente são similares, assim como há pequeno efeito no tempo de vida. Efeito similar é observado em 75% Gli/H₂O, mas a banda de emissão estimulada desaparece nessa condição. Em pH 2, os espectros são parecidos nas duas condições, mas a CB7 parece diminuir a amplitude da banda de emissão estimulada. Devido aos artefatos coerentes provenientes do laser, os dados de TAS da pBeet não puderam ser analisados utilizando o Surface Xplorer ou o Glotaran. Os ajustes não-lineares para estimar os tempos de vida foram realizados utilizando o Origin (OriginLab).

Para simplificação, iremos discutir apenas os espectros de decaimento associado após a análise global, que sintetizam os processos que acontecem após a excitação da *p*-NH₂-pBeet nas misturas de glicerol-água. Os espectros completos de absorção transiente em todas as condições, em conjunto com os ajustes dos decaimentos em comprimentos de onda específicos podem ser encontrados nos anexos 27 a 29. Os espectros de decaimento associado da *p*-NH₂-pBeet nas misturas glicerol/água (Figura 40) têm perfis similares aos respectivos espectros obtidos em água (Figura 35, p. 111). Em 25% Gli/H₂O, na presença e na ausência de CB7, observa-se a evolução de uma banda positiva de absorção do estado excitado em torno de 610 nm que foi atribuída a uma espécie transiente com tempo de vida em torno de 4 ps. Esse sinal é totalmente suprimido em meio ácido pH 2 e pouco evidente quando a quantidade de glicerol na mistura é aumentada para 75% (m/m).

Os espectros em meio ácido, contudo, revelam uma banda de absorção ESA com máximo ao redor de 440 nm que parece estar presente nos espectros obtidos em condições neutras junto a uma outra banda com máximo ao redor de 480 nm. A intensidade relativa das bandas em 440 nm e 480 nm muda com o tempo sugerindo que existem duas espécies excitadas diferentes e que a espécie com absorção em 480 nm desaparece com o aumento da absorção em 610 nm. Além disso, o espectro do componente com tempo de vida mais longo só mostra a banda com absorção em 440 nm, que é a mesma observada em meio ácido.

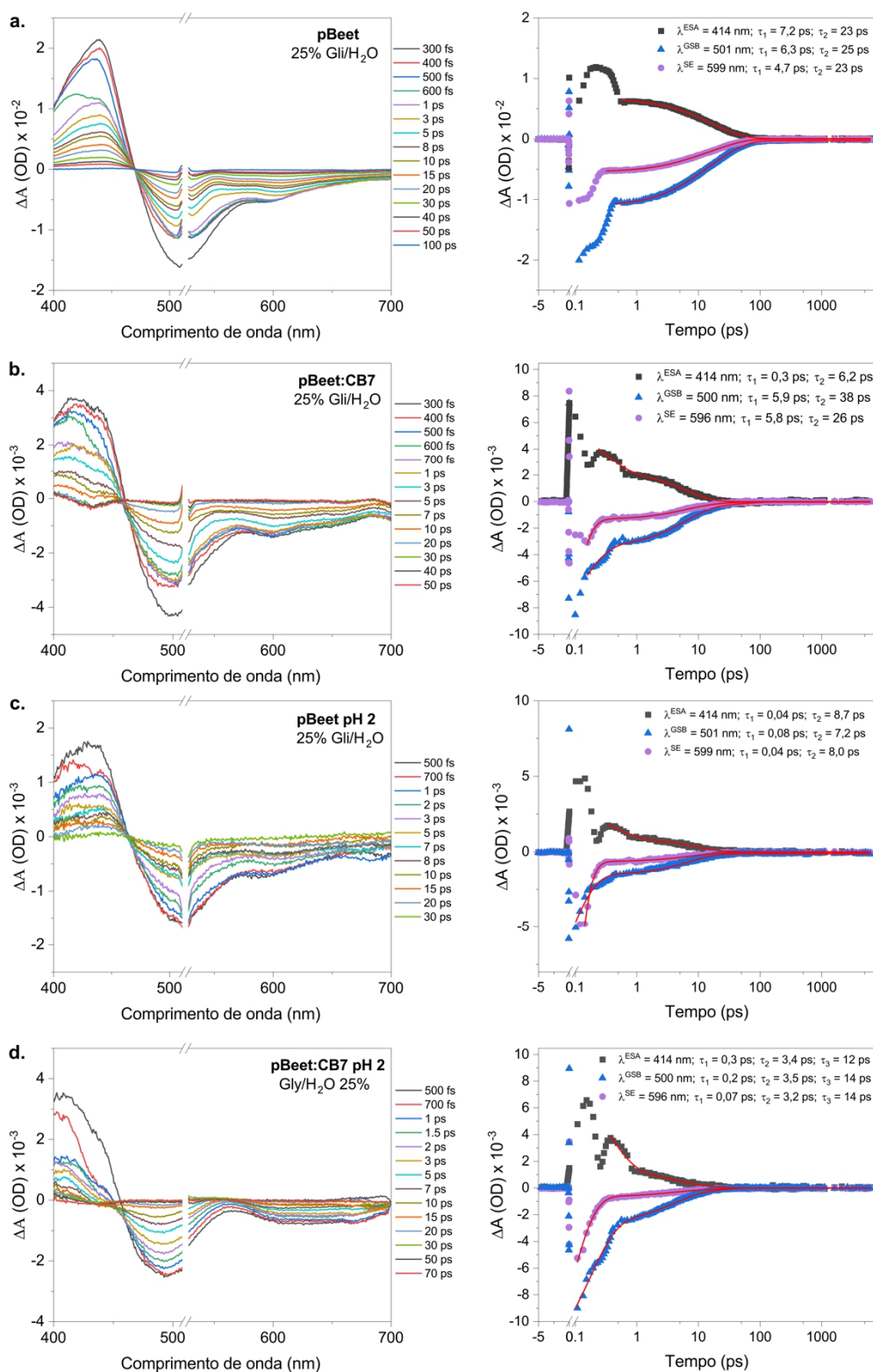


Figura 38. Espectro de absorção transiente em escala de femtosegundos da pBeet em misturas de 25% glicerol/água (m/m) em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (5eqs), $\lambda_{pump} = 520 \text{ nm}$.

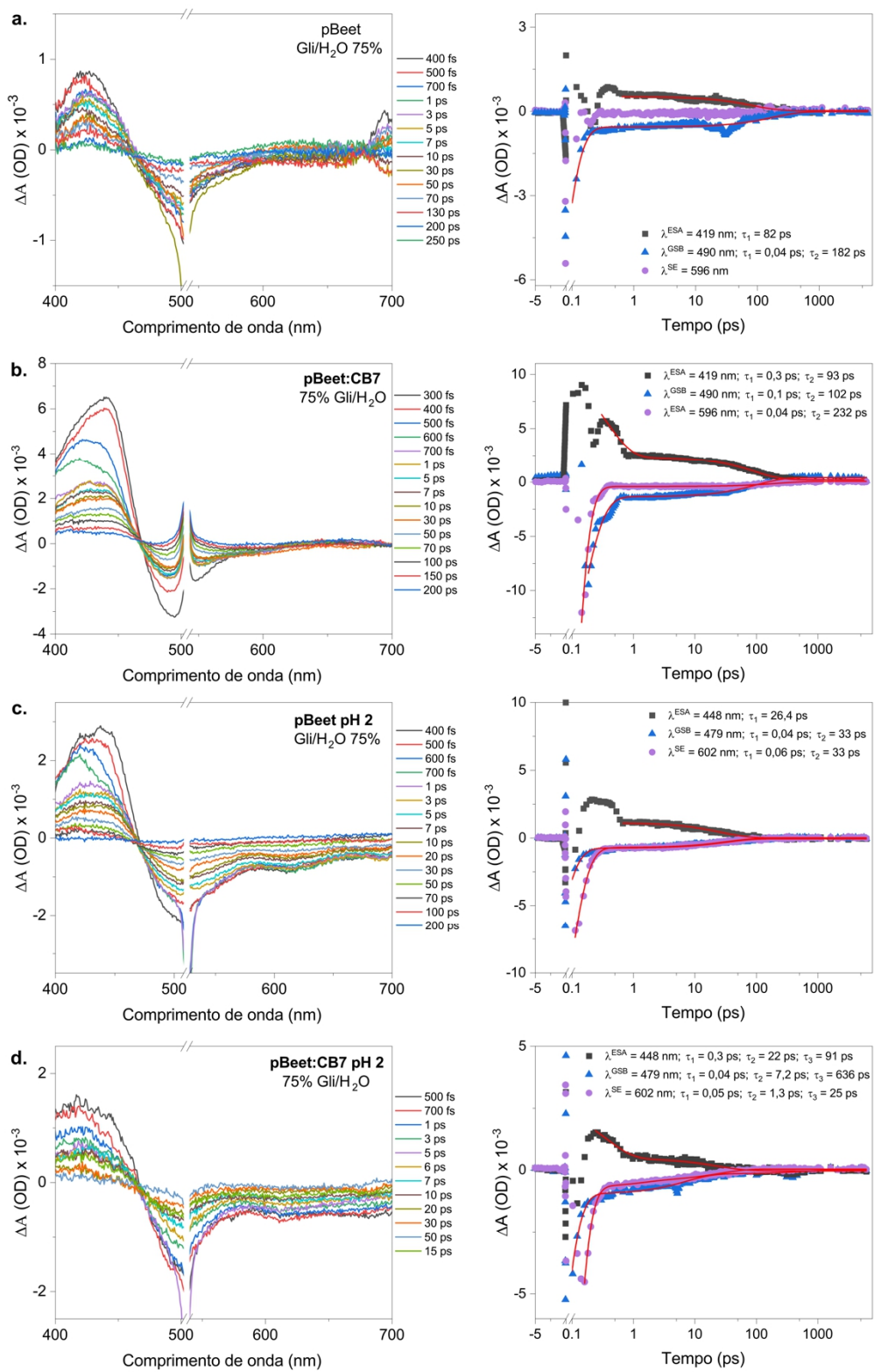


Figura 39. Espectro de absorção transitente em escala de femtosegundos da pBeet em misturas de 75% glicerol/água (m/m) em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (5eqs), $\lambda_{pump} = 520$ nm.

Tabela 12. Constantes de tempo de vida do estado excitado da pBeet em diferentes condições: misturas de glicerol/água (m/m), em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (CB7). ESA (absorção no estado excitado), GSB (branqueamento), SE (emissão estimulada).

pBeet 25% Gli/H₂O				pBeet 25% Gli/H₂O pH 2			
	τ_1 /ps	τ_2 /ps			τ_1 /ps	τ_2 /ps	
ESA, 414 nm	7,2	23,2		ESA, 414 nm	38 fs	8,7 ps	
GSB, 501 nm	6,3	24,6		GSB, 501 nm	78 fs	7,2 ps	
SE, 599 nm	4,7	23,0		SE, 599 nm	41 fs	8,0 ps	
pBeet:CB7 25% Gli/H₂O				pBeet:CB7 25% Gli/H₂O pH 2			
	τ_1 /fs	τ_2 /ps	τ_3 /ps		τ_1 /fs	τ_2 /ps	τ_3 /ps
ESA, 414 nm	278	6,2		ESA, 414 nm	341 fs	3,4 ps	11,7 ps
GSB, 500 nm	130	5,9	38	GSB, 500 nm	172 fs	3,5 ps	13,7 ps
SE, 596 nm	48	5,8	26	SE, 596 nm	74 fs	3,2 ps	13,8 ps
pBeet 75% Gli/H₂O				pBeet 75% Gli/H₂O pH 2			
	τ_1 /ps	τ_2 /ps			τ_1 /ps	τ_2 /ps	
ESA, 419 nm	82,3 ps			ESA, 448 nm	26,4 ps		
GSB, 490 nm	40 fs	182 ps		GSB, 479 nm	38 fs	32,8 ps	
SE, 596 nm				SE, 602 nm	58 fs	32,8 ps	
pBeet:CB7 75% Gli/H₂O				pBeet:CB7 75% Gli/H₂O pH 2			
	τ_1 /fs	τ_2 /ps			τ_1 /fs	τ_2 /ps	τ_3 /ps
ESA, 419 nm	344	93		ESA, 448 nm	364 fs	21,7 ps	90,8 ps
GSB, 490 nm	114	102		GSB, 479 nm	39 fs	7,2 ps	636 ps
SE, 596 nm	48	232		SE, 602 nm	50 fs	1,3 ps	25,3 ps

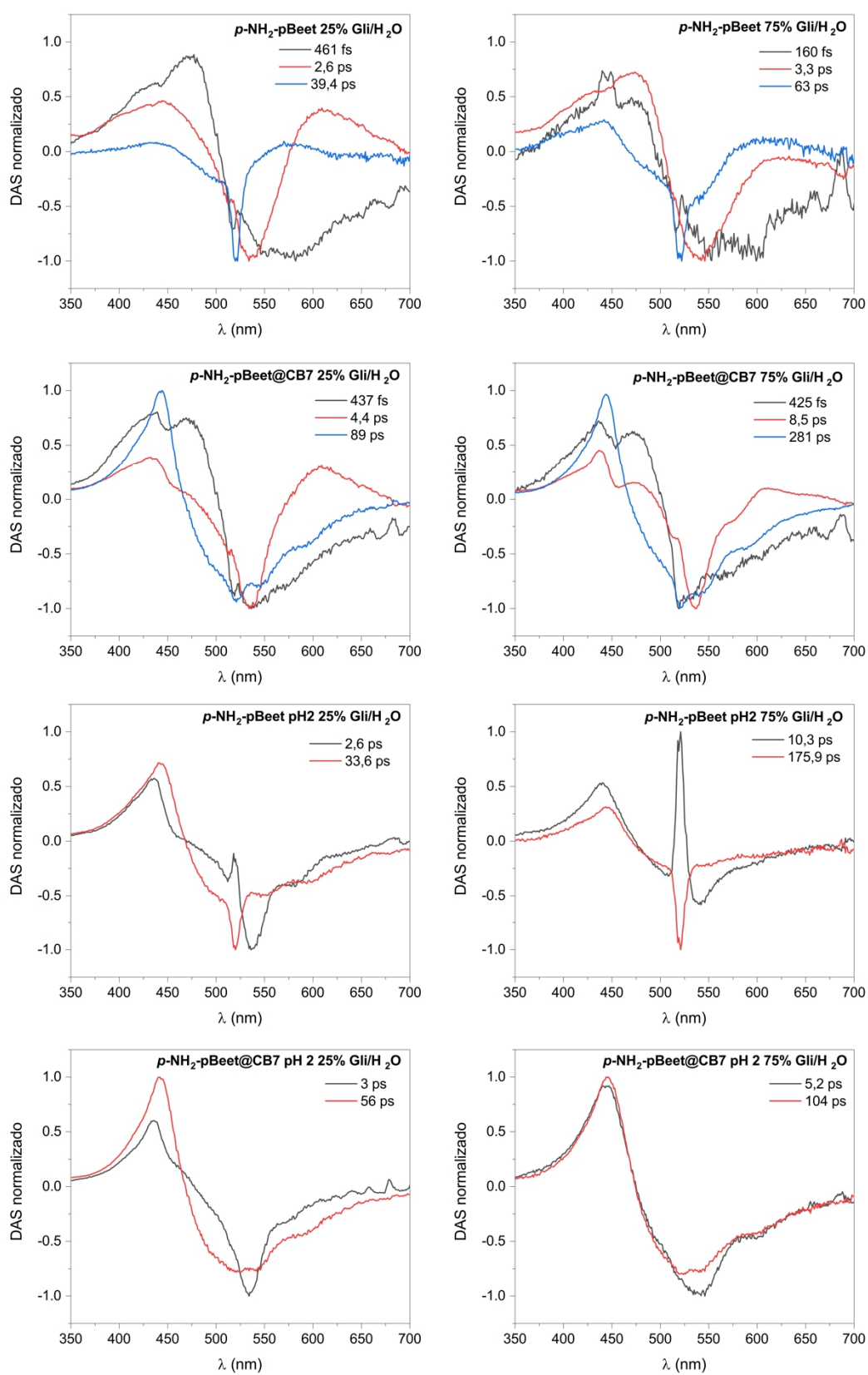


Figura 40. Espectros de decaimento associado (DAS) e os respectivos decaimentos temporais normalizados ajustados com três exponenciais com o software Glotaran da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em misturas de glicerol/água.

Os dados experimentais apresentados são resumidos a seguir. A *p*-NH₂-pBeet tem fluorescência máxima em solução em meio ácido o suficiente para protonar o N9 e o grupo *p*-amino. O rendimento quântico de fluorescência nessas condições é 0,6% e o tempo de vida de fluorescência é de 40 ps, indicando que a desativação não radiativa do estado excitado tem ampla preferência sobre a via radiativa ($k_r = 0,15 \text{ ns}^{-1}$ e $k_{nr} = 25 \text{ ns}^{-1}$). Os espectros de fluorescência normalizada resolvidos no tempo não se alteram durante esses 40 ps, indicando que a espécie emissiva é a mesma nesse período. Quando CB7 é adicionado nessas condições ácidas, o ϕ_{FI} dobra (1,2%) dada a diminuição de k_{nr} para 19 ns^{-1} pelo aumento da restrição vibracional e conformacional imposta pelo macrociclo à betalaína. Se o sistema é estudado em uma mistura de 25% (m/m) glicerol em água com concentração final de HCl de 10 mmol L^{-1} a viscosidade varia de 0,9 cP em água pura a $1,8 \text{ cP}^{[186]}$ e os resultados são muito parecidos, com um pequeno aumento do ϕ_{FI} na presença de CB7 (1,7%, $k_{nr} = 13 \text{ ns}^{-1}$). Nessas condições, a fração molar de glicerol é de 6% e a polaridade empírica do meio medida pela sonda de Reichardt na ausência de ácido diminui 2% (62,8 em água para 61,6).^[187] Quando a proporção de glicerol é aumentada para 75% (m/m), a presença de CB7 não afeta mais o valor de ϕ_{FI} (2,8% na presença ou ausência de CB7), indicando que embora a viscosidade nessas condições tenha aumentado 30× em relação a água (28 cP) isso acarretou um aumento de apenas 1,6× no ϕ_{FI} .

Em meio neutro a fluorescência de *p*-NH₂-pBeet diminui em relação ao meio ácido, permitindo inferir que a desprotonação das porções imínio e *p*-amônio se correlaciona com a diminuição dos valores de k_r na presença e ausência de CB7. Na ausência de CB7, o ϕ_{FI} é 0,02% e o tempo de vida do estado singlete é 20 ps, ampliando a diferença entre k_r ($= 0,01 \text{ ns}^{-1}$) e k_{nr} ($= 44 \text{ ns}^{-1}$) em relação aos dados obtidos em meio ácido. Outra diferença em relação aos resultados em meio ácido é que os espectros de fluorescência normalizada resolvidos no tempo mostram uma emissão inicial em 580 nm na forma de ombro no espectro, que desaparece após aproximadamente 2 ps. Os dados de absorção transiente mostram absorção de uma espécie com tempo de vida de 1,7 ps em torno de 610 nm, mesmas condições experimentais que para *p*-NH₂-pBeet em meio ácido. A adição de 25% (m/m) glicerol na água não afeta a banda de absorção em 610 nm. Contudo, a adição de glicerol resolve a banda de ESA em comprimentos de onda mais curtos permitindo observar dois máximos em cerca de 440 nm e 480 nm, fornecendo dados para a racionalização do alargamento dessa banda em água pura. O máximo em 440 nm coincide com o máximo da banda de ESA fina e resolvida observada em meio ácido na presença ou ausência de glicerol. A absorção em 480 nm desaparece na mesma escala de tempo que o sinal em 610 nm aparece, fornecendo suporte adicional a evidência que a forma protonada da *p*-NH₂-pBeet (imínio, *p*-amônio) no estado excitado absorve em 440 nm e que a

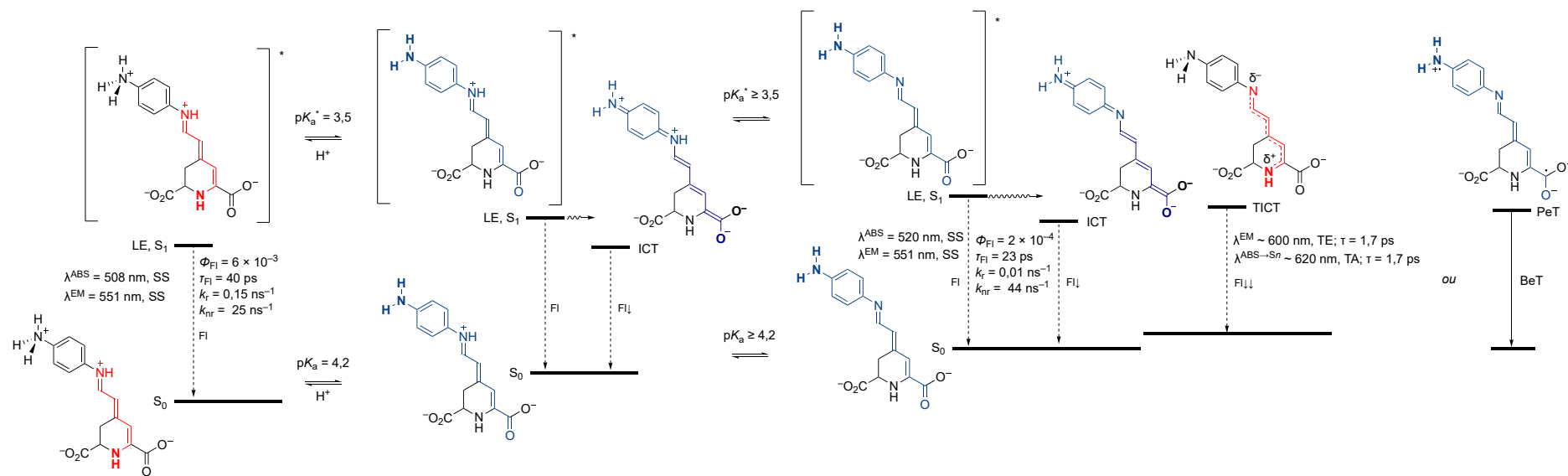
forma desprotonada (imina, *p*-amino) no estado excitado absorve em 480 nm e é convertida em poucos fs em uma espécie transiente com absorção em 610 nm que tem tempo de vida menor que 10 ps em qualquer condição experimental estudada. O aumento da proporção de glicerol para 75% (m/m) parece comprometer a população do estado com absorção em 610 nm, sem suprimi-lo totalmente. Essa diminuição da absorção na região do vermelho é acompanhada por um aumento dos rendimentos quânticos de fluorescência, sendo que com 75% Glic/H₂O e na presença de CB7 o valor de ϕ_{FI} atinge quase 10% e é acompanhado por uma diminuição expressiva de k_{nr} em relação ao valor determinado em água (3 ns⁻¹ vs. 14 ns⁻¹, respectivamente) e aumento da k_r (0,27 ns⁻¹ vs. 0,09 ns⁻¹, respectivamente).

A partir disso, propõe-se que a excitação de *p*-NH₂-pBeet (imínio, *p*-amônio), forma majoritária em meio ácido, leva a um estado localmente excitado (LE) que emite fluorescência com rendimento ao redor de 0,6%. Caso o sistema 1,7-diaza-heptametínio promova alguma transferência de carga no estado excitado, isso ocorre do N1 para o N9, no sentido do vetor de momento de dipolo do estado fundamental. Em pH 6, a desprotonação do grupo *p*-amônio o converte no substituinte doador amino e cria um sistema doador-aceptor (D – A) intramolecular na *p*-NH₂-pBeet que permite transferência de carga intramolecular (ICT) do grupo amino para o oxigênio *sp*² carboxílico, direção oposta à possível transferência de carga do sistema 1,7-diaza-heptametínio. Contudo, nesse caso, imagina-se que o aumento da planaridade do sistema pela conjugação entre o grupo *p*-amino e o sistema aza-oxo polimetínico poderia aumentar a fluorescência, em conflito com os dados experimentais, a menos que a energia do estado ICT seja menor que a do estado LE, situação na qual tipicamente se observa diminuição do ϕ_{FI} .^[188] Assim, considerando-se os valores de pK_a determinados e assumindo que os pK_{aHS} dos grupos imino são pouco maiores ou iguais aos dos grupos *p*-amino ($pK_{aH} = 4,2$), a rotação livre do grupo amino impede a transferência de carga desse grupo pelo sistema polimetínio e/ou favorece a ocorrência de transferência de elétron fotoinduzida (PeT) intramolecular. Em ambos os casos, deve-se observar uma diminuição do ϕ_{FI} . A existência de uma espécie transiente com absorção em cerca de 610 nm sugere que a desprotonação do grupo amino possa resultar na população de um estado excitado torcido de transferência de carga intramolecular (TICT, do inglês *twisted intramolecular charge transfer*)^[188,189] ou de um par radical-cátion radical-ânion não conjugado.

A cucurbiturila aumenta a emissão de fluorescência (e os τ_{FI}) das betalaínas. A CB7 aumenta os pK_a s dos grupos amino e imino, o que altera a proporção de *p*-NH₂-pBeet em cada estado de protonação, diminuindo a disponibilidade da betaxantina completamente desprotonada e que poderia atingir o estado TICT. Além disso, CB7 diminui os graus de

liberdade conformacional da *p*-NH₂-pBeet, favorecendo o estado planar LE e a via de desativação radiativa.

O aumento da viscosidade do meio provocado pelo glicerol também aumenta a emissão de fluorescência, apesar de não impedir as desativações via estado ICT e/ou TICT, que ainda é observada, mas tem amplitude menor com o aumento da viscosidade para 75% Gli/H₂O. A viscosidade do meio dificulta a formação do estado TICT devido à restrição estérica provocada pelo meio para que haja torção do anel, que pode ser considerado como um rotor molecular.^[190] Na presença de CB7 em glicerol, a componente de tempo mais curto é mantida, com desativação não-radiativa via estados ICT e/ou TICT, mas a componente de tempo mais longa torna-se emissiva, numa combinação da restrição provocada pela viscosidade do meio e pela CB7, que favorecem o estado LE.



Esquema 13. Proposta para racionalizar os dados de espectroscopia ultrarrápida da *p*-NH₂-pBeet.

2-3. Conclusões

A presença de um grupo *para*-amino conjugado ao cromóforo 1,7-diaza-heptametínio altera completamente a estabilidade hidrolítica, o efeito do pH e de CB7 sobre a absorção e fluorescência da *p*-NH₂-pBeet em comparação à fenil-betaxantina não substituída pBeet. A inclusão de ambas as betalaínas em CB7 ocorre na região do anel aromático, mas a presença do grupo amino induz a complexação de uma segunda molécula de CB7, alterando a sua posição na *p*-NH₂-pBeet. A presença do grupo amino livre, com possibilidade de ser protonado, favorece a formação de complexos mais estáveis. Além disso, a inclusão em CB7 resulta em um expressivo aumento da emissão de fluorescência da *p*-NH₂-pBeet, enquanto a emissão da pBeet é suprimida, o que também é observado com a protonação do grupo amino em meio ácido ou induzida pela complexação. O aumento dos pK_{as} dos grupos ionizáveis das duas betaxantinas pela complexação com CB7 amplia a faixa de pH em que estão protonadas, assim como diminui a região de pH em que a hidrólise é dominante, o que, em conjunto com a maior estabilidade dos complexos Bt@CB7 em meio ácido e neutro, amplia as possibilidades de aplicações para betalaínas. O efeito do grupo amino e da inclusão em CB7 no estado excitado foi estudado utilizando técnicas de espectroscopia resolvida no tempo. A *p*-NH₂-pBeet com os grupos amino e imino protonados é excitada para um estado localmente excitado, que retorna ao estado fundamental emitindo fluorescência, enquanto com a desprotonação da amina/imina, *p*-NH₂-pBeet atinge estados de transferência de carga intramolecular (ICT ou TICT), que inibem a fluorescência da betalaína. CB7 aumenta a restrição conformacional e vibracional das betalaínas, o que contribui com a diminuição das constantes não radiativas e aumento da fluorescência.

2-4. Parte experimental

2-4.1. Soluções

Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) 10 mmol L⁻¹: em um balão volumétrico, 68 mg de K_2HPO_4 (0,5 mmol) foi dissolvido em água deionizada e o volume foi ajustado a 50 mL.

Hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4) 10 mmol L⁻¹: em um balão volumétrico, 114 mg de K_2HPO_4 (0,5 mmol) foi dissolvido em água deionizada e o volume foi ajustado a 50 mL.

Solução tampão fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) 10 mmol L⁻¹, pH 6,9: A solução foi preparada pela mistura de volumes adequados de uma solução de KH_2PO_4 (10 mmol L⁻¹) com uma solução de K_2HPO_4 (10 mmol L⁻¹) até atingir o pH desejado (pH 6,9).

Solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 2,5: uma solução aquosa de KH_2PO_4 10 mmol L⁻¹ foi preparada e o pH foi ajustado até 2,5 com a adição de gotas de HCl 1 mol L⁻¹.

Dihidrogenofosfato de potássio (KD_2PO_4) 10 mmol L⁻¹: em um balão volumétrico, 13,8 mg de K_2HPO_4 (0,1 mmol) foi dissolvido em água deuterada e o volume foi ajustado a 10 mL.

Hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4) 10 mmol L⁻¹: em um balão volumétrico, 17,5 mg de K_2HPO_4 (0,1 mmol) foi dissolvido em água deuterada e o volume foi ajustado a 50 mL.

Solução tampão fosfato ($\text{D}_2\text{PO}_4^-/\text{DPO}_4^{2-}$) 10 mmol L⁻¹, pD 6,9: A solução foi preparada pela mistura de volumes adequados de uma solução de KD_2PO_4 (10 mmol L⁻¹) com uma solução de K_2DPO_4 (10 mmol L⁻¹) até atingir o pH desejado (o pH medido no pHmetro pode ser corrigido para o pD através da equação $\text{pD} = \text{pH} + 0,4$, de acordo com a referência ^[159]).

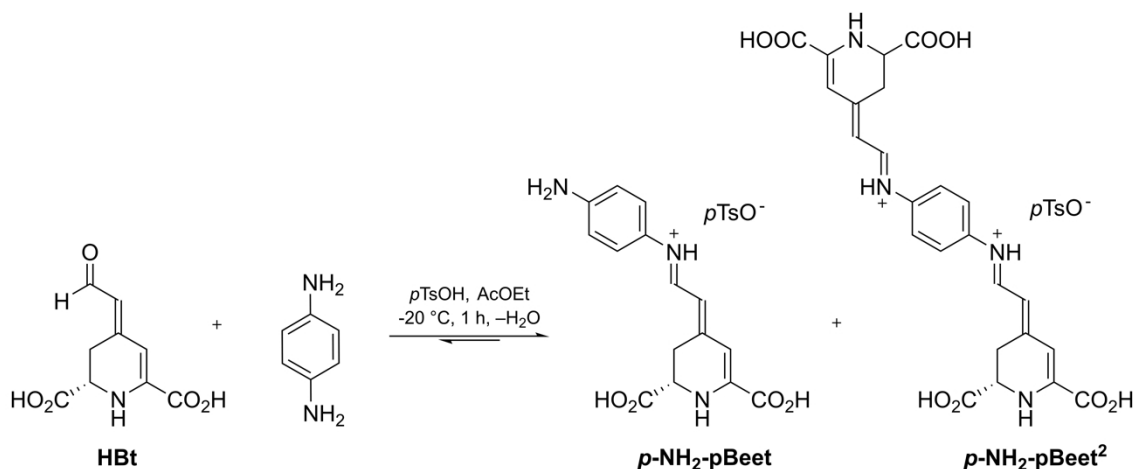
Solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pD 2,5: uma solução aquosa de KD_2PO_4 10 mmol L⁻¹ foi preparada e o pH foi ajustado até 2,1 (pD 2,5) com a adição de gotas de DCl 1 mol L⁻¹.

Misturas binárias de glicerol/ H_2O : as misturas de glicerol/água para os experimentos de espectroscopia de absorção transiente foram preparadas pesando glicerol e água nas proporções de acordo com Tabela 13.

Tabela 13. Massas de glicerol e água pesadas para as medidas de absorção transiente

$\%^{(m/m)} \text{Gli}/\text{H}_2\text{O}$	χ^{Gli}	m glicerol	m água
25%	0,06	35 mg	105 mg
75%	0,37	155 mg	52 mg

2-4.2. Semissíntese de *p*-NH₂-pBeet



Em um frasco de coloração âmbar, 5 equiv de ácido *p*-toluenosulfônico (0,06 mmol, 11 mg) e 10 equiv de *p*-fenilenodiamina (0,11 mmol, 12 mg) foram adicionados a 100 mL de uma solução 0,11 mmol L⁻¹ de ácido betalâmico em acetato de etila. A mistura de reação foi mantida no freezer (-20 °C) por 24 horas. A suspensão de *p*-NH₂-pBeet em acetato de etila foi centrifugada (10 min, 5000 ×g, 5 °C) e o sobrenadante removido. O precipitado foi dissolvido em água. *p*-NH₂pBeet foi purificada por cromatografia flash de exclusão em gel de Sephadex LH-20 e água (1,5 × 20 cm, 20 psi). A fração rosa foi coletada e utilizada imediatamente após a purificação.

2-4.3. Titulação da cucurbit[7]urila

A determinação da pureza de cucurbit[7]urila (CB[7]) foi determinada empregando-se o método de titulação com hexafluorofosfato de bis(ciclopentadienil)cobalto II (cobaltoceno) desenvolvido por Kaifer^[125], baseado na formação de um complexo de inclusão entre o cobaltoceno e a CB7, com estequiometria 1:1. Foi preparada uma solução de concentração nominal 1 mmol L⁻¹ de CB[7] em HCl 1 mmol L⁻¹. A 1 mL de uma solução de cobaltoceno de concentração 15 μmol L⁻¹ em HCl 1 mmol L⁻¹ em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 10-mm, foram adicionadas alíquotas de 8 μL de uma solução de CB[7] de concentração nominal 1 mmol L⁻¹ preparada em HCl 1 mmol L⁻¹. Os espectros de absorção foram adquiridos após a adição de cada alíquota, até que a absorbância em 261 nm se mantivesse constante. A concentração real da CB[7] pôde ser calculada através da intersecção entre as duas retas encontradas no gráfico da absorbância em 261 nm em função da concentração nominal de CB[7].

2-4.4. HPLC-MS

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) alta resolução foram realizadas em um equipamento MAXIS 3G da Bruker Daltonics com ionização por *electrospray* em modo positivo e detecção q-TOF. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Supelco Ascentis C18 – 250 x 4.6 mm – 5 µm, como fase estacionária e a eluição foi realizada com um gradiente de 2% de B por 7 min, de 2 a 30% de B em 15 min e de 30 a 95% de B em 45 minutos com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

2-4.5. Isoterma de complexação

Alíquotas de uma solução de CB7 ($6,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foram adicionadas a uma solução aquosa de betaxantina (pBeet ou *p*-NH₂-pBeet) de concentração $7,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em cubeta de quartzo de 1,5 mL e caminho ótico 10 mm, termostaticada a 25 °C. Os espectros de absorção e fluorescência foram registrados imediatamente após a adição de cada alíquota de CB7. As configurações do espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian utilizadas na aquisição dos espectros de fluorescência foram: $\lambda^{EX} = 470$ nm, intervalo de $\lambda^{EM} = 500-800$ nm; fendas de emissão/excitação = 20/20 (pBeet) ou 10/10 (*p*-NH₂-pBeet), tensão = 600 V.

2-4.6. Determinação de valores de pK_a

Titulação das betalainas livres

Alíquotas de 100 µL de uma solução de pBeet ou *p*-NH₂-pBeet foram adicionadas a 900 µL de tampão Britton-Robinson com pH desejado em cubetas de quartzo de 1,5 mL e caminho ótico 10 mm e os espectros de absorção e emissão foram registrados imediatamente. As configurações do espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian utilizadas na aquisição dos espectros de emissão estão na Tabela 14 (tensão da fotomultiplicadora: 600 V).

Titulação dos complexos betaxantina@CB7

As soluções-estoque dos complexos betaxantina@CB7 foram preparadas misturando alíquotas de soluções em água da betalaína e de CB7 em um frasco. As concentrações finais de cada componente na solução-estoque são apresentadas na Tabela 14. A quantidade de CB7 adicionada equivale a 20 vezes a de betalaína. As soluções foram mantidas em gelo durante a realização do experimento. A titulação foi realizada com a adição de alíquotas de 50 µL da solução-estoque do complexo betaxantina@CB7 à 450 µL de tampão acetato, fosfato ou borato com pH desejado em cubetas de quartzo de 1,5 mL e caminho ótico 10 mm; os espectros de absorção e emissão foram registrados imediatamente após a diluição das amostras. As

configurações do espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian utilizadas na aquisição dos espectros de emissão estão na Tabela 14 (tensão da fotomultiplicadora: 600 V).

Tabela 14. Condições experimentais da titulação para determinação do pK_a de Bx@CB7.

Betalaina	Concentração (estoque)	Concentração (cubeta)	λ^{EX}	Fendas ^{EX/EM}
pBeet	90 $\mu\text{mol L}^{-1}$	9 $\mu\text{mol L}^{-1}$	500	20/20
pBeet@CB7	52 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Bx 1,0 mmol L^{-1} CB7	5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,1 mmol L^{-1}	470	20/20
<i>p</i> -NH ₂ -pBeet	6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,65 $\mu\text{mol L}^{-1}$	470	20/20
<i>p</i> -NH ₂ -pBeet@CB7	53 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Bx 0,1 mmol L^{-1} CB7	5,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 0,1 mmol L^{-1}	470	10/10

2-4.7. Determinação do rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_{Fl}) da pBeet e *p*-NH₂-pBeet em tampão citrato/fosfato foram determinados pelo método de Williams^[191], método indireto baseado na comparação com padrão secundário, utilizando Rodamina B em metanol ($\phi_{Fl} = 0,7$)^[95] como padrão secundário de fluorescência. Os espectros de absorção e emissão foram adquiridos nas mesmas condições experimentais (fendas e tensão da fotomultiplicadora), mantendo a densidade óptica inferior a 0,1 para evitar efeitos de reabsorção. O ϕ_{Fl} foi calculado pela Eq. 9

$$\phi_{Fl}^x = \phi_{Fl}^p \frac{A^p}{A^x} \frac{S^x}{S^p} \left(\frac{n^x}{n^p} \right)^2 \quad \text{Eq. 9}$$

onde, ϕ_{Fl} = rendimento quântico de fluorescência
 A = absorvância no comprimento de onda selecionado;
 S = área sobre a curva de emissão
 n = índice de refração do solvente
 Coeficiente x = representa a amostra
 Coeficiente p = representa o padrão de fluorescência

Os espectros de emissão foram adquiridos em cubetas de quartzo de 1,5 mL e caminho óptico de 1 cm, nas mesmas condições experimentais ($\lambda^{EX} = 470 \text{ nm}$; $\lambda^{EM} = 500 - 800 \text{ nm}$, $f^{EX} = f^{EM} = 20 \text{ nm}$, tensão = 600 V).

2-4.8. Cinética da decomposição

A persistência das betalaínas e dos seus complexos com CB7 em solução (tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 2,5 e 6,9) foi monitorada espectrofotometricamente por 6 h com intervalos entre 5 e 15 minutos a 25 °C. As constantes observadas de velocidade (k_{obs}) para a hidrólise das betalaínas foram calculadas pelo ajuste mono- ou bi-exponencial da mudança de absorção no máximo em função do tempo. Nos pHs em que não foi possível monitorar a decomposição por pelo menos uma meia vida devido ao lento decaimento, o ajuste exponencial foi realizado considerando $y_0 = 0$.

Para a determinação do efeito isotópico cinético do solvente, as cinéticas em tampão deuterado foram realizadas nas mesmas condições experimentais. As soluções de betalaína e cucurbiturila foram preparadas em D₂O.

2-4.9. Tempo de vida de fluorescência

As medidas foram realizadas empregando-se um sistema de laser ultrarrápido Ti:Safira (Jasper 10, JSP1100Q) com amplificador regenerativo e alinhado a um amplificador paramétrico óptico (OPA) sintonizável (Harmony). Amostras com absorção igual a 0,5 no comprimento de onda com máximo de absorção foram colocadas em cubetas com caminho óptico de 10 mm. A irradiação foi feita focalizado-se o feixe do laser na parede da cubeta de forma a reduzir o caminho óptico para 1-2 mm. A fluorescência a 90° foi detectada por um sistema *streak camera* com janela de observação de cerca de 200 nm (Bruker SPEC 250IS, Hamamatsu C5680) acoplada a uma unidade Synchroscan M56750. O dispositivo de carga acoplada da câmera (CCD, Hamamatsu Orca-ER C4742-95) foi usado em modo de armazenamento (2 × 2 pixels) para fornecer uma matriz de 512 × 512 pixels.

Para ajustar os dados das medidas do *streak câmera*, assume-se que o IRF possui um perfil temporal gaussiano com largura σ e uma localização temporal de t_0 . Assim, tem-se:

$$F_{Gauss}(t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{Eq. 10}$$

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln 2} \quad \text{Eq. 11}$$

Os ajustes dos dados cinéticos dos decaimentos foram feitos empregando-se:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n B_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{Eq. 12}$$

onde, I corresponde a intensidade de fluorescência, t para o tempo, e B_i e τ_i para amplitudes e

tempo de vida de fluorescência dos decaimentos exponenciais de n componentes, respectivamente.

A combinação das equações (Eq. 10 – Eq. 12) com os processos de reconvolução, resulta na equação de ajuste mono-exponencial usada para obter os tempos de vida de fluorescência das amostras.

$$I_{fit}(t) = \frac{1}{2} I_0 e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau}\right) \times e^{\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2}\right)}} \left(1 + erf\left(\left(\frac{\sigma}{\tau} - \frac{t-t_0}{\sigma}\right) \cdot \frac{1}{\sqrt{2}}\right)\right) \quad \text{Eq. 13}$$

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

As imagens e decaimentos obtidos no *streak camera* foram gerados por um programa de MatLab, escrito no grupo do Prof. Jacinto Sá em Uppsala.

Capítulo 3

Automontagem de nanofios quirais betalaínicos

3-1. Introdução

Automontagem é um processo espontâneo no qual entidades moleculares se organizam em agregados supramoleculares através de interações não-covalentes. A formação de agregados estáveis e com estrutura definida requer um bom ajuste dos blocos de construção e a presença de grupos funcionais capazes de interações fortes e direcionais.^[192–196] A automontagem é a força-motriz da vida, sendo utilizada pela natureza para criar sistemas mais complexos e que carregam informações e funções combinadas melhores do que dos seus componentes isolados.

A agregação molecular envolve interações não-covalentes intra- e intermoleculares como – por exemplo – interações hidrofóbicas, empacotamento- π , ligações de hidrogênio, ligações de halogênio e ligações coordenadas.^[196] Agregados são classificados como sendo do tipo *J* ou do tipo *H* conforme a sua morfologia. Agregados *H* contém moléculas empilhadas de forma simétrica, enquanto nos agregados *J* as moléculas estão organizadas em uma estrutura similar a uma parede de tijolos e podem formar hastes longas e finas.

Algumas macromoléculas se organizam espontaneamente para formar agregados supramoleculares com estruturas helicoidais,^[197] sendo a hélice do DNA o exemplo clássico dessa estruturação. A coloração iridescente azul ou verde observada na natureza em alguns organismos, como besouros, pássaros e plantas e chamada de cor estrutural, é resultado da organização de nanofibrilas de polissacarídeos, como quitosana ou celulose, empilhadas em nanoestruturas helicoidais.^[198]

Uma classe de compostos interessantes que forma agregados helicoidais são as cianinas. Elas possuem como cromóforo uma estrutura alongada com densidade eletrônica π alternada ao longo da cadeia polimetínica, o que provoca uma alta polarizabilidade que dá origem a forças

de atração dispersiva (interações de van der Waals) entre as cadeias polimetínicas e é o principal fator na formação de extensos agregados de cianinas. As ligações C=C são alternadas e possuem ordem de ligação 1,5, contribuindo para a cadeia polimetínica ser planar e rígida. A cor de indocianinas é determinada pelo tamanho da cadeia polimetínica, cada unidade adicional do grupo vinílico (vinileno) provoca um deslocamento batocrômico de cerca de 100 nm no espectro de absorção. Cianinas polimetínicas podem formar agregados *J* devido a sua planaridade e alta polarizabilidade ao longo da cadeia polimetínica, que contribuem com as interações intermoleculares responsáveis pela agregação.^[199–201]

O sistema cromofórico 1,7-diaza-heptametínio presente em betalaínas como a betanina e a indicaxantina permite que as consideremos cianinas pentametínicas, resultando em pigmentos naturais polimetínicos quirais, devido ao carbono assimétrico de configuração *S* no núcleo betalâmico ou no substituinte derivados de aminoácidos, no caso de betaxantinas naturais.^[202]

Uma supramolécula quiral não possui elementos de simetria, e as moléculas do monômero pode estar dispostas de forma helicoidal em relação ao eixo do agregado *J*, tornando-o opticamente ativo.^[201,203] Como há dois sentidos possíveis de rotação da hélice em relação ao eixo, estruturas helicoidais podem ter enantiômeros.

Dicroísmo circular é uma técnica sensível para detectar a formação de agregados helicoidais.^[197] Acoplamentos de éxciton acontecem quando dois ou mais cromóforos – com a mesma ou similar energia de excitação – estão próximos e empacotados de forma quiral um em relação ao outro.^[204] A interação existente entre esses cromóforos espacialmente próximos torna o estado excitado não apenas concentrado no monômero, mas deslocalizado por todos os cromóforos constituintes do sistema, tornando-se um *éxciton*.^[199,205] Os cromóforos possuem um grande momento de transição elétrico devido à intensa transição π - π^* , que interagem e acoplam, provocando um desdobramento dos níveis de energia do estado excitado, resultando em dois novos estados excitados. No dicroísmo circular, a transição de um éxciton do estado fundamental para o estado excitado resulta em um par de intensas bandas de dicroísmo circular com sinais opostos e áreas similares, denominado acoplamento excitônico (*éxciton couplet*). Cada uma dessas bandas com sinais opostos é chamada de *Efeito Cotton*. O primeiro *Efeito Cotton* ser positivo e o segundo negativo ou vice-versa é uma consequência da quiralidade do agregado. Se imaginarmos a disposição das moléculas do monômero no agregado como um parafuso, podemos ter: (i) *quiralidade de éxciton positiva*, na qual o sentido do parafuso de mão direita e resulta num espectro com primeiro efeito *Cotton* positivo e segundo efeito *Cotton* negativo; (ii) *quiralidade de éxciton negativa*, na qual o sentido do parafuso é anti-horário, que resulta num espectro com primeiro efeito *Cotton* negativo e segundo efeito *Cotton*

positivo.^[204,205] O comprimento de onda em $y = 0$ entre as bandas opostas de efeito Cotton geralmente corresponde ao comprimento de onda no máximo de absorção do agregado.^[206] Espectros de dicroísmo circular com acoplamento excitônico costumam ser observados quando há automontagem de agregados helicoidais quirais.^[200,206–208]

3-2. Resultados e discussão

3-2.1. Semissíntese e caracterização estrutural

A presença de um grupo amino livre na *p*-amino-pBeet possibilita a reação dessa betalaina com uma segunda molécula de HBt levando à formação de uma bis-betaxantina de cor azul que foi chamada de WireBeet. Quando a reação entre ácido betalâmico e *p*-fenilenodiamina é feita com excesso de 10 equiv do aldeído observa-se a formação de WireBeet. Entretanto, HBt é um reagente escasso e seu uso em excesso é pouco vantajoso. Por isso, um método alternativo para a síntese da bis-betaxantina foi desenvolvido. Uma solução de *p*-NH₂-pBeet pura em água foi acidulada até pH 1,8 com HCl 1 mol L⁻¹ e mantida a 4 °C por 1 h para favorecer a precipitação de WireBeet. A hidrólise da *p*-NH₂-pBeet nessas condições produz ácido betalâmico que ao reagir com uma molécula de *p*-NH₂-pBeet produz a WireBeet que em sua forma totalmente protonada precipita como um sólido azul. WireBeet foi lavada com água até a neutralização, que é evidenciada pela mudança da cor da água de lavagem de incolor para roxo, solubilizada em água e purificada por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20 em água (rendimento: 30%). As frações roxas foram coletadas, reunidas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o uso.

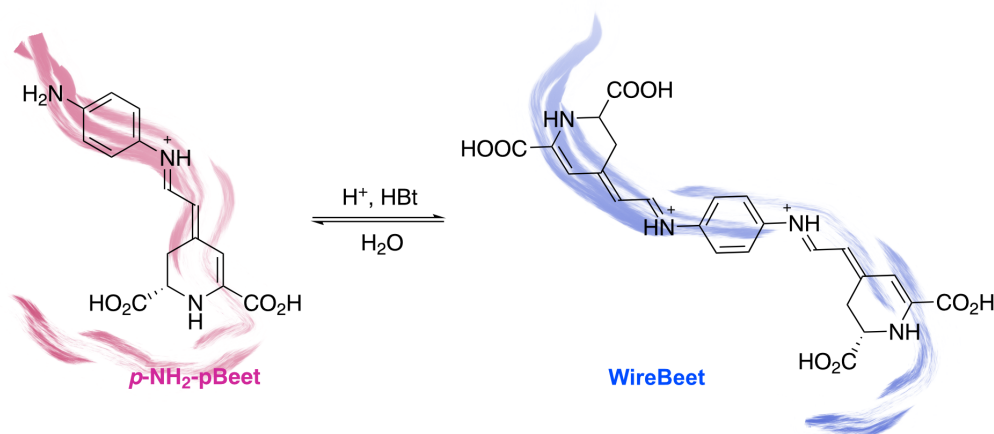


Figura 41. Esquema simplificado do equilíbrio químico em água existente entre a monobetalaina *p*-NH₂-pBeet, de coloração cor de rosa, e WireBeet, de coloração azul.

WireBeet foi caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* em modo positivo e detecção por tempo de voo (HPLC-ESI(+)-qTOF-MS) (Figura 42). As espécies com tempo de retenção 15,1 min apresentam m/z 495,1511 e 248,0790, valores compatíveis com os calculados para o íons $[M+H]^+$ (m/z 495,1510, erro 0,2 ppm) e $[M+2H]^{2+}$ (m/z 248,0792, erro -0,8 ppm) da WireBeet. As distribuições isotópicas estão de acordo com os valores esperados. Devido ao equilíbrio químico existente entre a *p*-NH₂-pBeet e a bis-betaxantina, observou-se também um pico cromatográfico com $t_R = 12,8$ min e relação m/z 302,1136, compatível com o esperado para o íon $[M+H]^+$ da *p*-NH₂-pBeet.

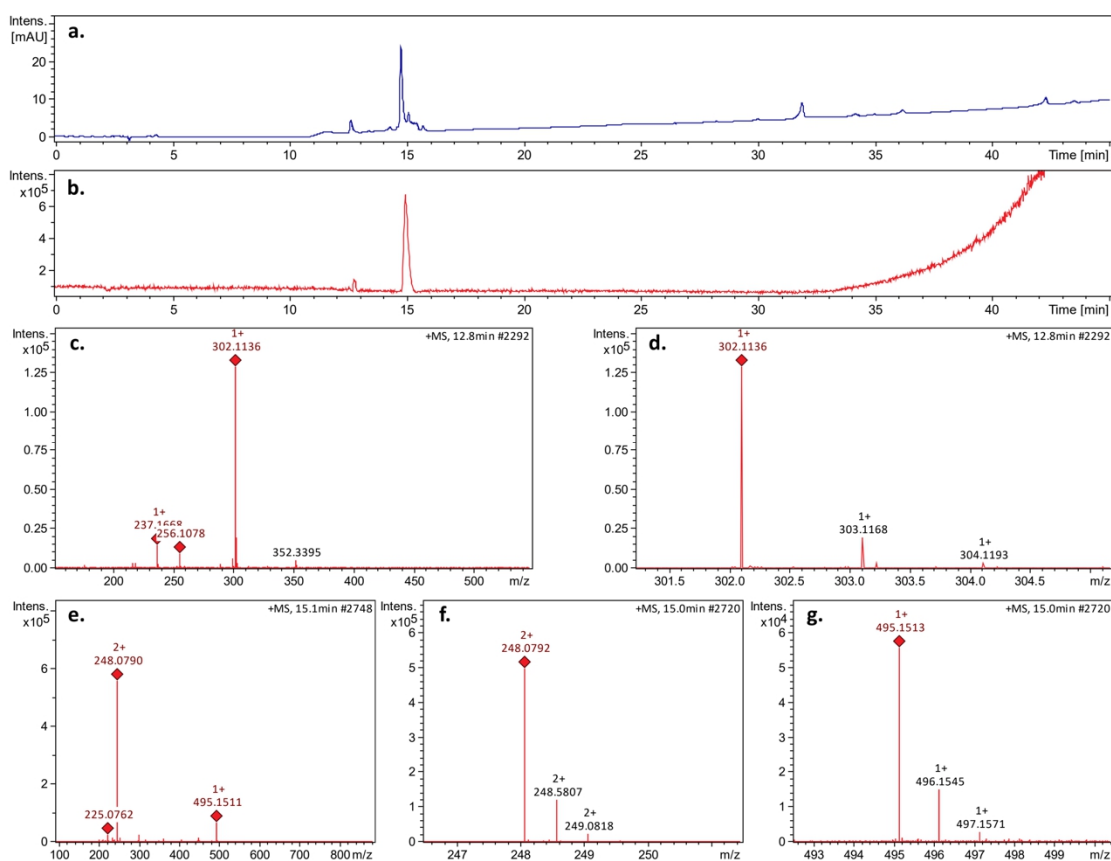


Figura 42. Análise da WireBeet por HPLC-ESI-qTOF-MS. (a) Cromatograma com detecção por absorção em 254 nm; (b) Cromatograma de íons totais da WireBeet; (c) Espectro de massas de alta resolução da espécie com $t_R = 12,8$ min; (d) Distribuição isotópica do pico com m/z 302,1136; (e) Espectro de massas de alta resolução das espécies com $t_R = 15,1$ min; (f) Distribuição isotópica do pico com m/z 248,0792; (g) Distribuição isotópica do pico com m/z 495,1513.

O espectro de RMN de ^1H da WireBeet em D_2O é apresentado junto ao espectro da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ para comparação (Figura 43). Os sinais do anel aromático da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ mostram o padrão típico de sistemas *para*-dissubstituídos: dois dubletos bem definidos que correspondem aos pares H11/H15 (7,22 ppm) e H12/H14 (6,89 ppm). O acoplamento de uma segunda unidade de HBt forma a WireBeet que, por ter um elemento de simetria C2 (Figura 44), reduz os sinais correspondentes aos quatro hidrogênios do sistema aromático a um singlete alargado em 7,34 ppm. Devido à simetria da WireBeet os hidrogênios que são equivalentes não aparecem de forma duplicada no espectro, ou seja, os H8, H7, H5, H2 e H3a/b e os correspondentes provenientes do segundo HBt acoplado (denominados H') possuem os mesmos deslocamentos químicos, mas com integral aproximadamente igual a 2.

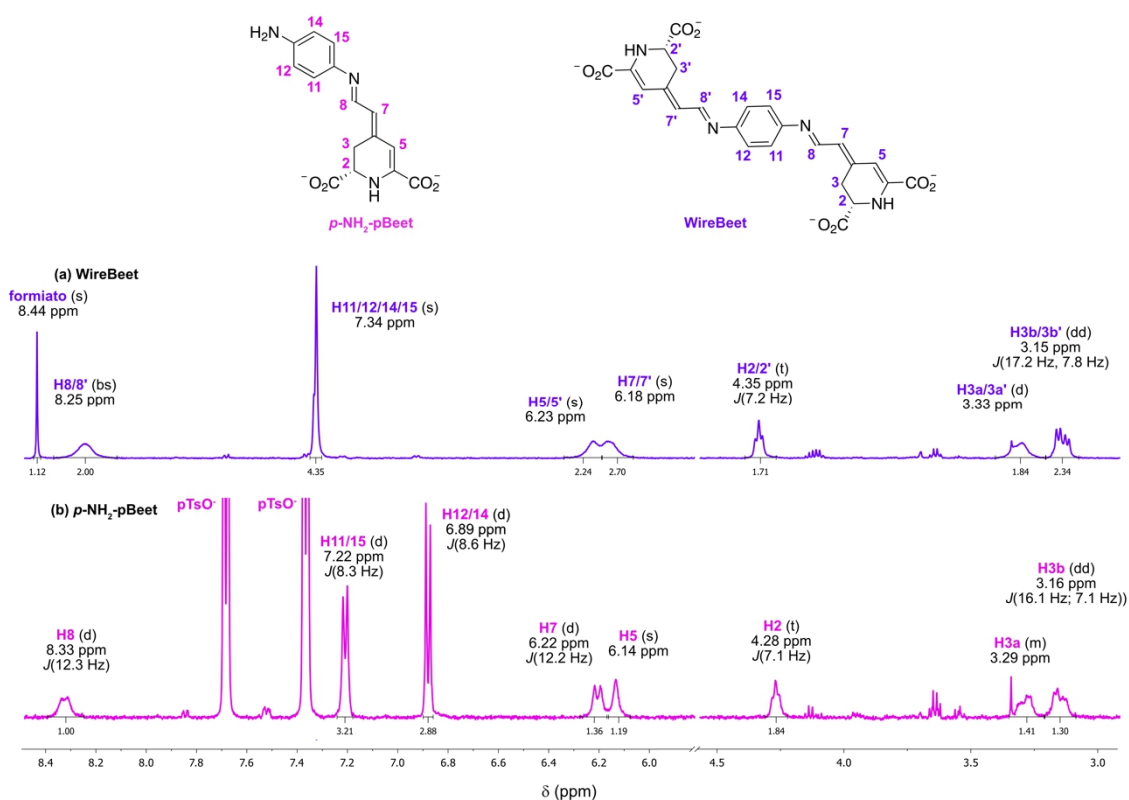


Figura 43. Espectros de ^1H -RMN da (a) WireBeet. O sinal observado em 8,44 ppm corresponde ao ânion formiato^[209-211] proveniente da purificação por HPLC semi-preparativo da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ precursora; e da (b) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em D_2O a 25°C com supressão *zgpr*.

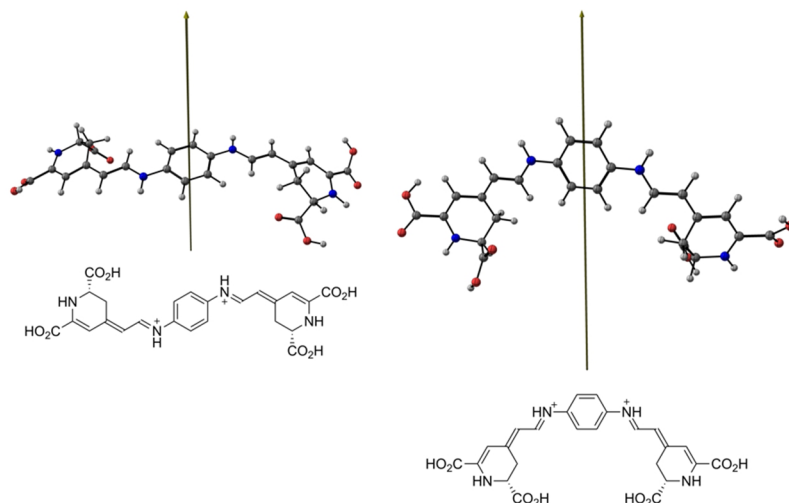


Figura 44. Estrutura de dois confôrmeros da WireBeet simetrizados para corresponder ao grupo de ponto C2. O eixo de simetria é apresentado para conveniência.

Os pares H11/15 e H12/14 da *p*-NH₂-pBeet estão em ambientes químicos diferentes devido à assimetria da molécula, que torna H12/14 mais blindado pelo efeito doador de elétrons do grupo amino livre ao anel aromático. A adição da segunda molécula de HBT torna todos esses hidrogênios equivalentes e produz um ambiente químico mais desblindado na região dos hidrogênios aromáticos. Conforme discutido no Capítulo 2, é provável que a *p*-NH₂-pBeet esteja presente como uma mistura da forma amina/imina e amina/imínio.

Os desdobramentos do duplo dubleto correspondente ao H3b da WireBeet são evidentes, enquanto na *p*-NH₂-pBeet os picos estão coalescidos. Para calcular as constantes de acoplamento (*J*) desses hidrogênios em que não há um desdobramento completo dos picos foi utilizada a ferramenta GSD (*Global Spectral Deconvolution*) do software MestreNova. As constantes de acoplamento do H2 com os dois H3 são próximas para ambos os compostos ($J^{2,3} = 7,1$ Hz). Entretanto, a constante de acoplamento $J^{3a,3b}$ entre os hidrogênios geminais H3a e H3b é maior na WireBeet ($J^{3a,3b} = 17,2$ Hz) do que na *p*-NH₂-pBeet ($J^{3a,3b} = 16,1$ Hz), mas é similar a determinada para betalaínas naturais e semissintéticas.^[42,60,62,88,90,212] A estimativa utilizando o GSD para determinar $J^{3a,3b}$ da *p*-NH₂-pBeet devido a coalescência dos sinais pode ter subestimado o seu valor.

O H8 da WireBeet é mais blindado do que o da *p*-NH₂-pBeet. Enquanto na *p*-NH₂-pBeet os H5 e H7 estão bem resolvidos e é possível observar o desdobramento em dubleto do H7 devido ao acoplamento com H8 ($J^{7,8} = 12,2$ Hz), no espectro da WireBeet os sinais do H5 e H7 estão sobrepostos, coalescidos e há inversão do H7 para a região mais blindada e do H5 para a mais desblindada, típico de efeitos eletrônicos na porção aromática.^[91] Para EWG em *para* os

dados da literatura mostram que H5 é mais desblindado que H7, enquanto para EDG o oposto é verdade. Para a pBeet (não substituída) não é possível resolver os sinais de H5 e H7.^[91] Assim, a amostra de *p*-NH₂-pBeet analisada parece ter uma fração da forma *p*-NH₂ maior que *p*-NH₃⁺ que resulta em um H5 médio mais blindado em relação a H7. Para a WireBeet, o resultado indica que o grupo betalainil ligado pelo N *sp*² tem propriedades atraentes de elétrons, possivelmente por ter uma fração protonada abundante nas condições da análise.

3-2.2. Constantes de dissociação ácida

A bis-betaxantina foi titulada através da aquisição de espectros de absorção e fluorescência imediatamente após a diluição de alíquotas de uma solução concentrada em água em tampões Britton-Robinson na faixa de pHs entre 2 e 12 (Figura 45). Na faixa de pH entre 2,9 e 7,0 não há mudança evidente no espectro de absorção da WireBeet. Ela possui máximo de absorção em 578 nm e um ombro em 475 nm. Esse ombro não é correspondente ao HBT ($\lambda_{\text{máx}} = 424$ nm) nem à *p*-NH₂-pBeet ($\lambda_{\text{máx}} = 520$ nm), que eventualmente deve estar presente na solução em pequenas concentrações devido ao equilíbrio químico. É comum que betalaínas derivadas de anilinas possuam bandas de absorção no visível como Gaussianas simétricas, correspondentes à transição $S_0 \rightarrow S_1$ ^[175]. É possível que esse ombro seja proveniente da transição eletrônica para outros níveis de energia ou da existência de outros isômeros em solução (*e.g.* *E/Z*).

Foram determinados dois pK_{as} (2,7 e 4,1) e o pK de hidrólise ($pK_{\text{hidr}} = 9,1$) pelo ajuste sigmoidal das curvas de titulação. Todas as betalaínas semissintéticas tituladas nesse trabalho possuem um pK_{a} em torno de 2,6, correspondente ao(s) grupo(a) ácido(s) carboxílico(s) da porção betalâmica. Em todos os casos descritos nessa Tese e na literatura, esse equilíbrio tem efeito sutil no espectro de absorção e a desprotonação diminui a emissão de fluorescência das betalaínas. Na WireBeet, a mudança do pH do meio entre 2 e 3 é acompanhada por uma mudança brusca na cor da solução de azul para roxo. O espectro de absorção da WireBeet em meio ácido pH 2,2 possui dois máximos de absorção principais sobrepostos em 620 nm e 700 nm, além de dois ombros em 480 nm e em 520 nm. Essa mudança na cor como resultado da protonação dos ácidos carboxílicos da molécula não influencia diretamente o cromóforo da bis-betaxantina e é resultado da participação do grupo ácido carboxílico em ligações de hidrogênio intermoleculares para a formação de agregados, o que será discutido em mais detalhes no último item desse capítulo.

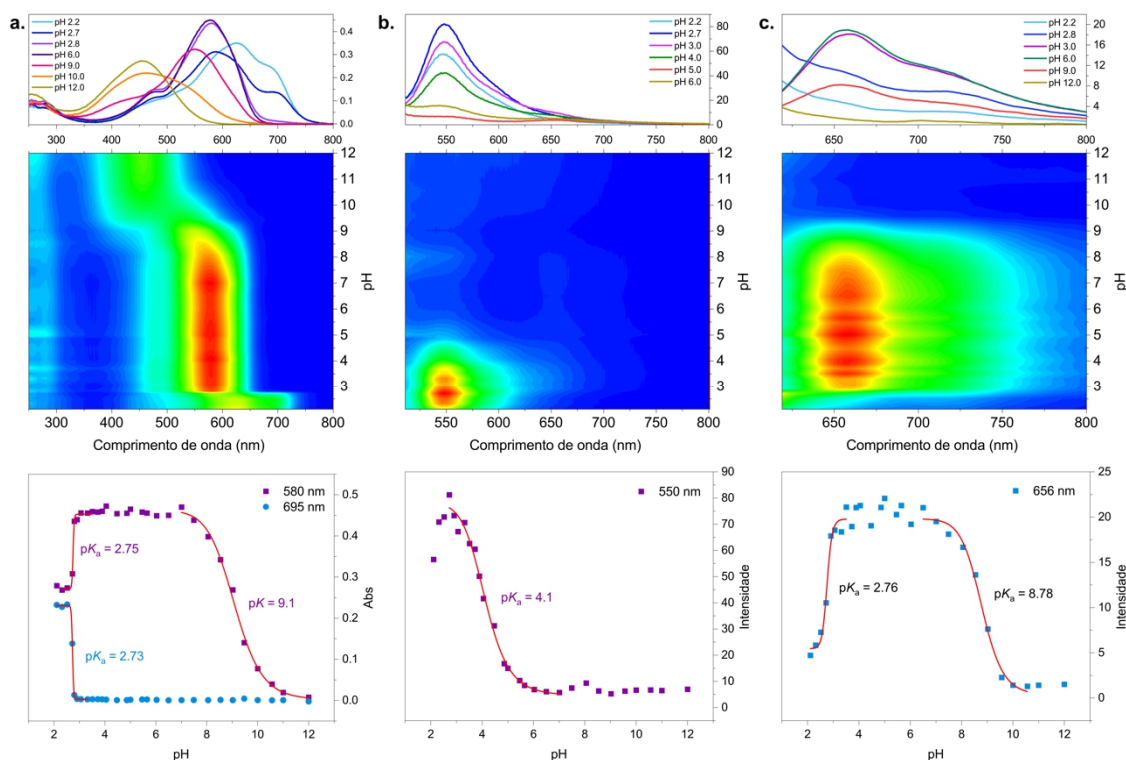


Figura 45. Titulação da WireBeet (a) Gráfico de contorno dos espectros de absorção da WireBeet e a correspondente curva de titulação; (b) Gráfico de contorno dos espectros de emissão da WireBeet ($\lambda^{\text{EX}} = 475 \text{ nm}$) e a correspondente curva de titulação; (c) Gráfico de contorno dos espectros de emissão da WireBeet ($\lambda^{\text{EX}} = 580 \text{ nm}$) e a correspondente curva de titulação. Fendas de excitação (EM/EX) = 20/20.

A WireBeet também foi titulada por emissão de fluorescência, com $\lambda^{\text{Exc}} = 475 \text{ nm}$ e $\lambda^{\text{Exc}} = 580 \text{ nm}$ (Figura 45b, c, respectivamente). A excitação em 475 nm resulta em uma banda de emissão de fluorescência com $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ e $pK_a = 4,1$. Esse perfil é comum à *p*-NH₂-pBeet e pode ser proveniente da sua presença em pequenas quantidades devido ao equilíbrio existente entre as duas betalainas. Uma banda de emissão com $\lambda_{\text{max}} = 656 \text{ nm}$ na faixa de pH entre 2,9 e 7,0 é detectada ao ser excitada em 580 nm. Os dois pK_a s determinados são próximos ao obtidos com a titulação por absorção.

A estimativa dos pK_a s da WireBeet com o software MarvinSketch sugere que os ácidos carboxílicos de uma porção betalâmica da molécula são muito mais ácidos do que o da outra porção (Figura 46). Dessa forma, eles estariam desprotonados em toda a faixa de pH em que o experimento foi realizado e o $pK_a = 2,7$ corresponderia apenas aos ácidos carboxílicos de uma das porções betalâmicas da WireBeet.

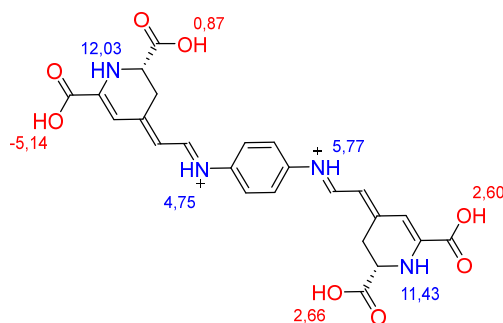


Figura 46. pK_{as} da WireBeet estimados pelo software MarvinSketch.

3-2.3. Coeficiente de absorção molar e hidrólise de WireBeet

O ϵ da WireBeet foi determinado através do método do ponto final (Figura 47a),^[26,213] no qual ela foi hidrolisada em meio alcalino a 25 °C e a concentração inicial de betalaína foi calculada a partir da concentração final de HBt formado ($\epsilon_{424nm} = 27000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[92]. A hidrólise da WireBeet em tampão Britton-Robinson pH 8,5 foi monitorada espectrofotometricamente até a sua hidrólise completa. O espectro de absorção da WireBeet também foi adquirido em tampão BR pH 5, permitindo determinar a absorção inicial da solução de betalaína em uma condição em que a hidrólise é mais lenta.

A hidrólise da WireBeet ocorre em duas etapas sucessivas: primeiro há a hidrólise em uma das iminas da betalaína, formando uma molécula de HBt ($\lambda = 430 \text{ nm}$) e *p*-NH₂-pBeet ($\lambda = 520 \text{ nm}$) que, em sequência, também é hidrolisada em HBt, resultando em 2 moléculas de HBt ao final da hidrólise completa (Esquema 14). A velocidade de decomposição da WireBeet foi monitorada em 620 nm, pois não há sobreposição com a banda de *p*-NH₂-pBeet ($k_{obs} = 2,73 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 620 \text{ nm}$). No decorrer da cinética, observa-se que a banda em 570 nm correspondente à WireBeet desloca-se até 520 nm, absorção característica da *p*-NH₂-pBeet. Devido à alta sobreposição das bandas de absorção das duas betalaínas, não foi possível obter uma boa separação das bandas mesmo calculando a segunda derivada. Entretanto, após 2,5 h de reação, toda a WireBeet já foi hidrolisada em *p*-NH₂-pBeet, o que possibilita o ajuste da sua constante cinética em 520 nm a partir desse tempo ($k_{obs} = 0,902 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). A curva cinética de formação de ácido betalâmico foi ajustada com duas constantes exponenciais: $k_{obs} = 2,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $k_{obs} = 1,05 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, que correspondem à hidrólise da WireBeet e da *p*-NH₂-pBeet, respectivamente.

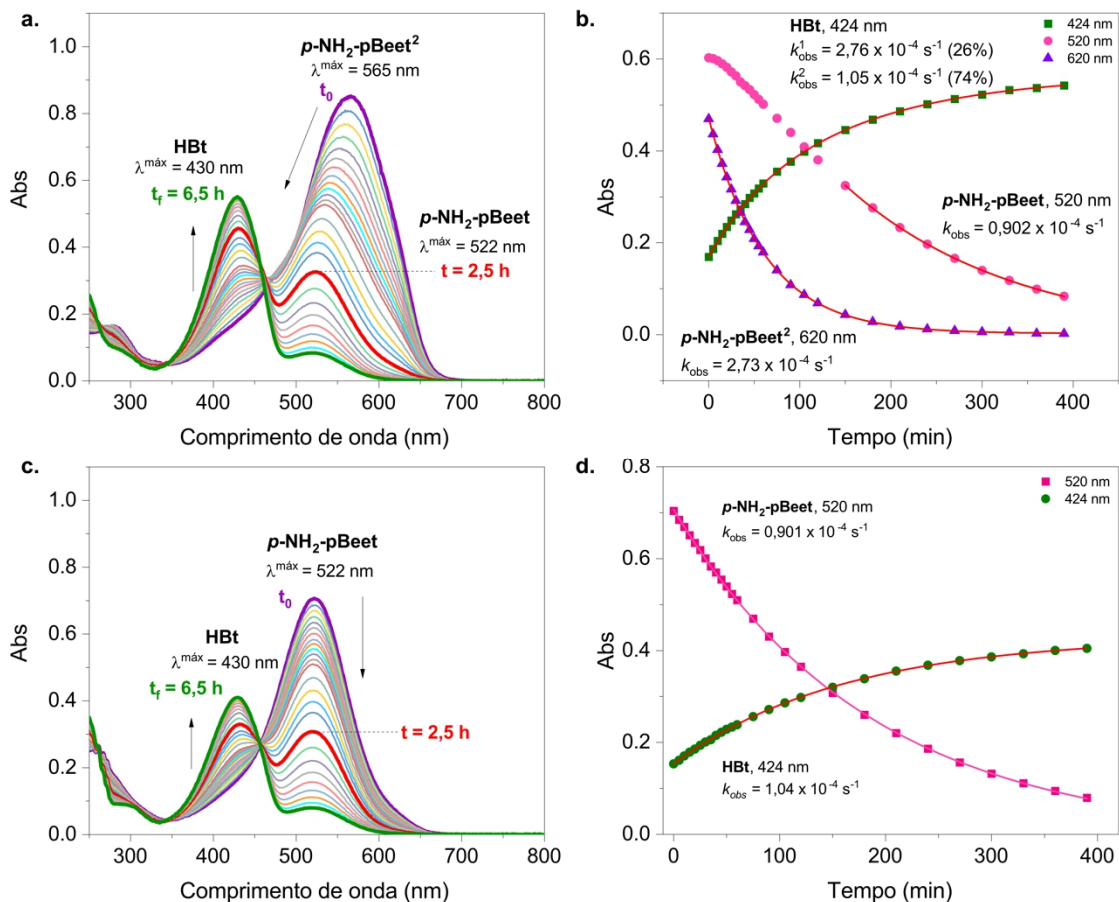
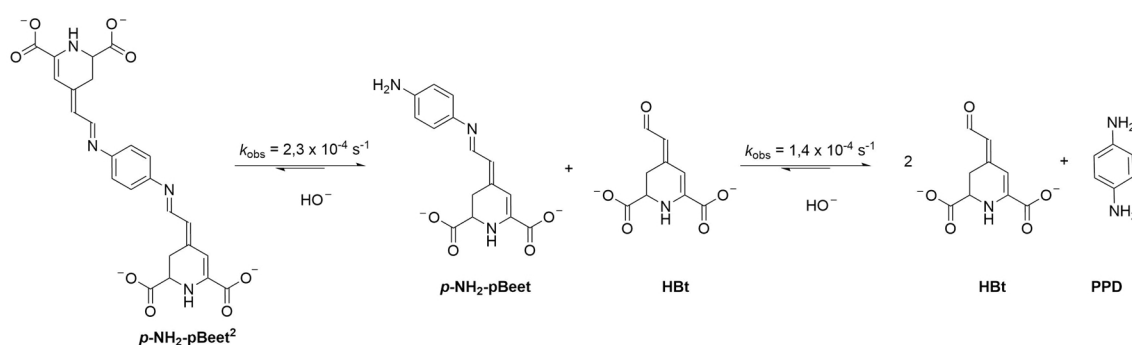


Figura 47. Determinação do coeficiente de absorção molar da WireBeet. (a) Cinética de decomposição da WireBeet monitorada por espectroscopia UV-Vis; (b) Decaimentos da reação de hidrólise da WireBeet (620 nm) e formação de HBt (424 nm). (c) Cinética de decomposição da *p*-NH₂-pBeet monitorada por espectroscopia UV-Vis (d) Decaimentos da reação de hidrólise da *p*-NH₂-pBeet (520 nm) e formação de HBt (424 nm). As linhas vermelhas são os ajustes exponenciais das curvas.

A cinética de decomposição da *p*-NH₂-pBeet foi adquirida nas mesmas condições experimentais (Figura 47) e possibilitou a obtenção da sua constante de velocidade de decomposição ($k_{\text{obs}} = 0,901 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$) e da constante de velocidade de formação do HBt proveniente apenas da hidrólise da *p*-NH₂-pBeet ($k_{\text{obs}} = 1,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\lambda = 424 \text{ nm}$). Os valores das constantes cinéticas são próximos e indicam a completa conversão da betalaína em HBt. Adicionalmente, as constantes de formação do HBt a partir das duas betalaínas são similares, contribuindo com a hipótese de que a hidrólise da WireBeet ocorre de maneira consecutiva, formando *p*-NH₂-pBeet como produto intermediário da sua hidrólise completa em HBt.

A hidrólise do primeiro HBt da WireBeet ser mais rápida do que da *p*-NH₂-pBeet contribui com a hipótese de que uma das porções betalâmica da WireBeet atua como um substituinte atraente de elétrons, enquanto a outra porção tem papel de *eléctron sink*, o que aumenta a eletrofilicidade do carbono carbonílico. A constante cinética de hidrólise observada da WireBeet em pH 8,5 é similar a constante de hidrólise de betalaínas derivadas de anilinas com substituintes atraentes de elétrons como a *p*-F-pBeet ($k_{\text{obs}} = 2,70 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)^[91]. Quando *p*-NH₂-pBeet é formada, a velocidade de hidrólise torna-se mais lenta devido ao efeito doador de elétrons do grupo amino livre, que diminui a eletrofilicidade do carbono carbonílico da betalaína.



Esquema 14. Hidrólise da WireBeet em ácido betalâmico (HBt) e *p*-fenilenodiamina (PPD) em tampão BR, pH 8,5

Para o cálculo do coeficiente de absorção molar da WireBeet é necessário considerar que cada molécula da betalaína forma 2 moléculas de ácido betalâmico. Dessa forma, a concentração final de HBt é o dobro da concentração inicial da WireBeet, o que foi acrescentado à equação que relaciona os dois compostos a partir da Lei de Beer:

$$\varepsilon_{578}^{Bt^2} = \frac{2 \cdot Abs_{i,pH 5}^{Bt^2} \cdot \varepsilon^{HBt}}{Abs_{final}^{HBt}} \quad \text{Eq. 14}$$

O coeficiente de absorção molar calculado em 578 nm é $101131 \pm 4520 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Comparativamente, *p*-NH₂-pBeet possui $\varepsilon = 57000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o que mostra que a adição de uma segunda molécula de HBt provoca o aumento do ε em quase o dobro, devido à extensão da cadeia azopolimetínica conjugada e consequente diminuição da diferença de energia HOMO-LUMO da transição eletrônica, resultando em uma betalaína com coeficiente de absorção molar consideravelmente maior do que o de todas as outras betalaínas já reportados.

3-2.4. Absorção transiente

A fotofísica de absorção resolvida no tempo da WireBeet em água foi estudada por espectroscopia de absorção transiente no laboratório do Prof. Jacinto Sá na Universidade de Uppsala. Para a aquisição dos espectros de absorção transiente, a amostra de WireBeet em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm foi excitada com pulso de laser em 575 nm (*pump*). A Figura 48 permite acompanhar a evolução temporal dos espectros de absorção transiente após a excitação com a *pump*. Nos primeiros 200 fs, observa-se a existência de uma banda correspondente à recuperação do branqueamento do estado fundamental (GSB) em $\lambda = 600$ nm e duas bandas de absorção do estado excitado (ESA) centralizadas em $\lambda = 500$ nm e 725 nm (essa segunda parece a continuação de uma banda com λ máximo em uma região fora da região de detecção).

Em uma análise qualitativa da evolução espectral de cada banda identificada na absorção transiente, a banda referente ao branqueamento do estado fundamental (GSB) desloca o $\lambda_{\text{máx}}$ de 590 nm para 585 nm em 250 fs, e vai desaparecendo até cerca de 50 ps. Esse deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$ nos primeiros femtossegundos deve ser resultado do rearranjo do solvente. É um pouco difícil avaliar o comprimento de onda máximo desse processo, pois é próximo ao espalhamento da *pump* em 575 nm. Entretanto, é perceptível que o $\lambda_{\text{máx}}$ mantém-se constante em 585 nm até cerca de 2 ps, a partir do qual desloca-se para valores menores atingindo $\lambda_{\text{máx}} = 566$ nm, próximo da recuperação completa do estado fundamental.

A absorção do estado excitado (ESA) em 500 nm desaparece em cerca de 7 ps, tempo consideravelmente menor do que o da banda de GSB. Na região de 680 nm, a partir de 400 fs observa-se o aparecimento de uma nova banda de absorção do estado excitado centrada em $\lambda = 660$ nm, que atinge o seu máximo em 3,2 ps, a partir do qual começa a decair até desaparecer em cerca de 50 ps, assim como a banda de GSB. A partir de 3,8 ps, o $\lambda_{\text{máx}}$ dessa banda de ESA começa a se deslocar para λ s de maior energia, atingindo 634 nm antes de desaparecer. Um ombro de ΔA negativo em 620 nm correspondente à emissão estimulada é observado nos primeiros femtossegundos após a excitação pela *pump* (200 fs), mas o surgimento da banda positiva em 660 nm sobrepõe-se a ele no decorrer do tempo, até o seu completo desaparecimento e predominância da ESA em 660 nm. Um ponto isobéptico em 527 nm entre a banda de absorção do estado excitado em 500 nm e o branqueamento do estado fundamental é observado nos primeiros 3,0 ps, mas deixa de existir após esse tempo, o que é temporalmente próximo ao momento em que a banda de ESA que está sendo formada em 660 nm atinge o seu máximo.

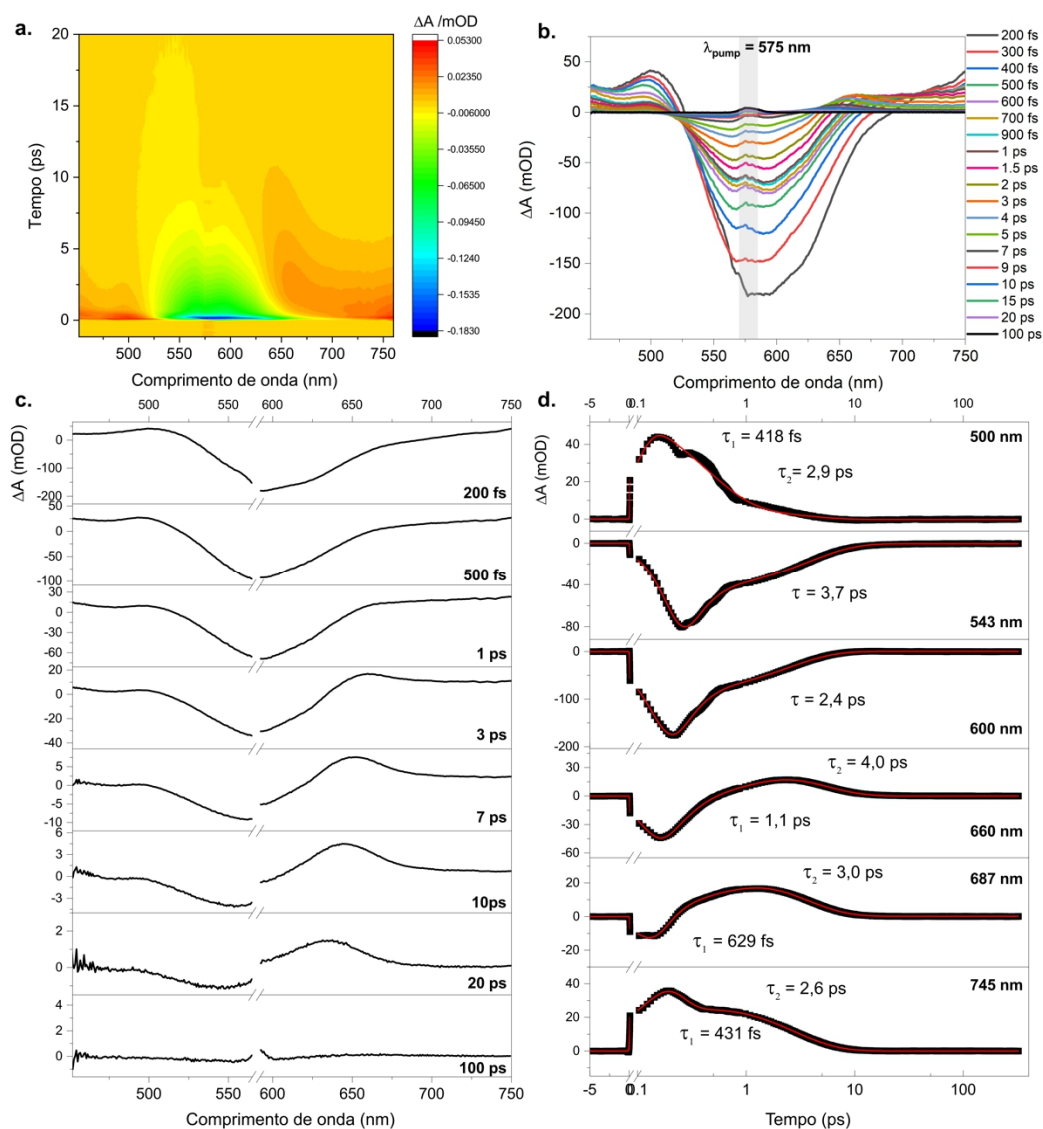


Figura 48. (a) Gráfico de contorno dos espectros de absorção transiente da WireBeet após excitação em 575 nm (b). Espectros de absorção transiente ultrarrápida em escala de femtosegundos da WireBeet; (c) Espectros de absorção transiente resolvida no tempo em tempos selecionados; (d) Traços cinéticos extraídos das medidas de absorção transiente em comprimentos de onda definidos e ajustados com o software Surface Explorer; $[WireBeet] = 35 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Dois tempos de vida (τ) foram determinados a partir do ajuste do traço cinético extraído em 500 nm utilizando o software Surface Explorer: $\tau_1 = 418 \text{ fs}$ e $\tau_2 = 2,9 \text{ ps}$ (Figura 48b, Tabela 15). Para o *branqueamento do estado fundamental*, dois tempos de vida também foram determinados, nos cortes em 543 e 600 nm. Dessa forma, o branqueamento do estado fundamental possui $\tau = 3,7 \text{ ps}$ em 543 nm e $\tau = 2,4 \text{ ps}$ em 600 nm. O comportamento temporal da segunda banda de absorção do estado excitado em $\lambda = 725 \text{ nm}$ é interessante e difere do observado para outras betalaínas, como a *p*-NH₂-pBeet. Com a evolução temporal, observa-se

não só o decaimento da banda em torno de 725-700 nm, mas o aparecimento de uma nova banda de absorção do estado excitado em 660 nm após cerca de 1 ps da excitação, o que é indício da existência de um processo que ocorre no estado excitado (Figura 48c). Dois tempos de vida foram determinados ajustando em 660 nm: 1,1 ps e 4,0 ps.

Tabela 15. Constantes de tempo da WireBeet em meio aquoso calculadas utilizando o software Surface Explorer.

	IRF	τ_1	τ_2	τ_3
EAS, 500 nm	72,2 fs	418 fs	2,9 ps	
GSB, 543 nm	134,9 fs	171,0 fs	3,7 ps	
GSB, 600 nm	118,2 fs	143,7 fs	2,4 ps	
ESA, 660 nm	85,8 fs	140,9 fs	1,1 ps	4,0 ps
ESA, 687 nm	74,2 fs	71,8 fs	629 fs	3,0 ps
ESA, 745 nm	153,1 fs	52,7 fs	431 fs	2,6 ps

A análise global foi realizada com o auxílio do software Glotaran^[180], utilizando um modelo sequencial com três constantes, possibilitando o ajuste simultâneo de toda a evolução temporal do espectro transiente. Os espectros de evolução associada (EAS) e os seus respectivos tempos de vida são apresentados na Figura 49. O EAS representa a evolução espectral das espécies no estado excitado com suas respectivas constantes de tempo. O componente mais rápido de 179 fs representa a evolução do branqueamento do estado fundamental e a absorção do estado excitado ($S_1 \rightarrow S_n$) após a excitação ultrarrápida $S_0 \rightarrow S_1$. O segundo e terceiro componentes possuem tempos de vida similares, mas perfis espectrais de evolução diferentes. O segundo componente $\tau_2 = 2,61$ ps apresenta a diminuição do estado excitado em 500 nm e do branqueamento do estado fundamental e um aumento da absorção do estado excitado em 660 nm (ou absorção do estado fundamental fotoinduzido). O $\tau_3 = 2,66$ ps é a evolução (aumento) da absorção do estado excitado em 660 nm, com pequena contribuição do branqueamento do estado fundamental.

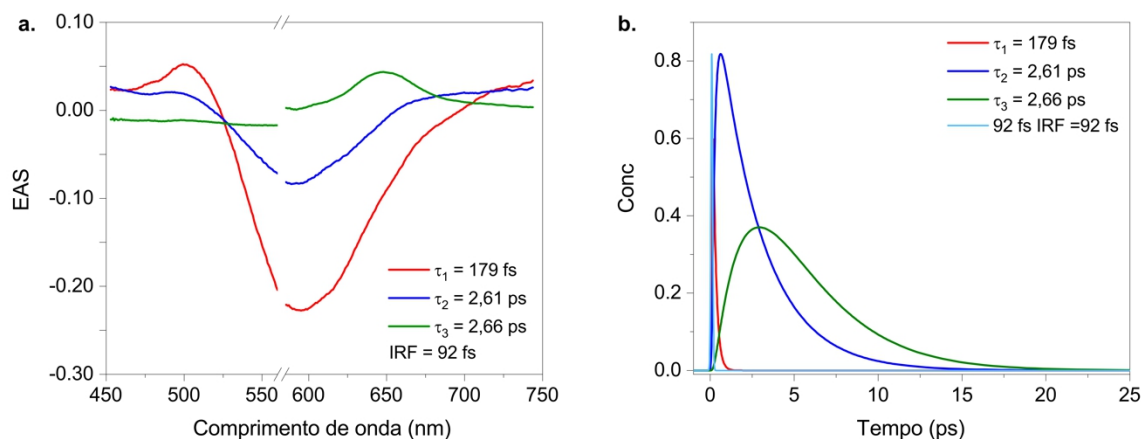


Figura 49. (a) Espectros de evolução associada (*Evolution-associated spectra, EAS*) com modelo sequencial; (b) perfis cinéticos associados a cada EAS determinados com ajuste por análise global com modelo sequencial.

O comportamento observado após a excitação ultrarrápida da WireBeet é diferente do comportamento de betalaínas naturais como a betanina e a miraxantina, em que não há ocorrência de outros processos fotofísicos no estado excitado, além da absorção do estado excitado, branqueamento do estado fundamental e emissão estimulada provocadas pela excitação com o laser.^[97,175] Na WireBeet, além desses processos, observa-se o aparecimento de uma banda positiva em cerca de 660 nm que parece estar associada ao decaimento da absorção no excitado $S_1 \rightarrow S_n$, sugerindo que há a conversão do estado excitado S_1 para esse novo estado em 660 nm.

Essa banda positiva pode ser atribuída a ocorrência do cruzamento da intersecção cônica (IC) numa conversão interna para um estado fundamental eletrônico “quente”. Após o cruzamento pela intersecção cônica, a molécula pode retornar para o estado fundamental da sua configuração inicial (hipoteticamente *trans*) ou para o estado fundamental do isômero com maior energia (*cis*), que possivelmente converte-se de volta na forma *trans* por isomerização térmica. O decaimento da ESA em 660 nm e a recuperação do GSB por tempos mais longos e deslocados em relação ao início do processo pode ser um indício da isomerização para a forma *cis*, mas não possuímos evidências de como é o espectro de absorção no estado estacionário desse isômero mais energético.

Um modelo para os processos fotofísicos observados é apresentado na Figura 50, como um diagrama unidimensional simplificado representado as superfícies de energia potencial relacionadas aos estados fundamental e excitado das formas *trans* e *cis* da WireBeet. O esquema considera a hipótese do comportamento da WireBeet ser similar ao de cianinas^[214–217] e o estado

excitado S_1 não possuir barreira entre os estados S_1 do isômero *trans* e do *cis*, facilitando a passagem pela intersecção cônica. O decaimento do estado S_1 para a região de intersecção cônica, o que pode levar de volta ao estado fundamental da forma *trans* (ou isômero inicial) por um decaimento não-radiativo (via perda vibracional) ou pode ocorrer a isomerização para a forma *cis* (ou isômero de maior energia), que decai de volta ao isômero *trans* via isomerização térmica reversa.

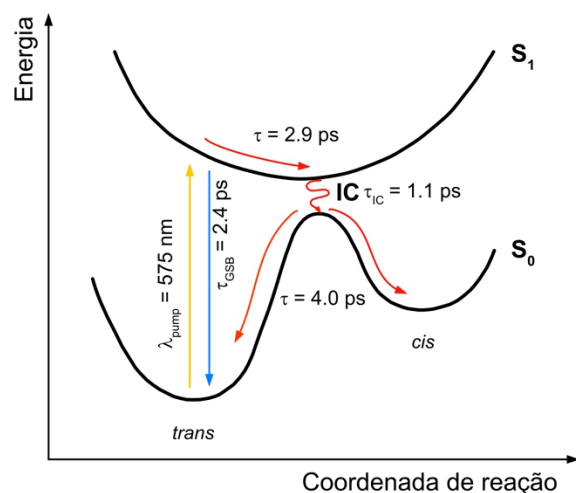


Figura 50. Diagrama simplificado unidimensional das superfícies potenciais envolvidas no decaimento ultrarrápido durante a fotoisomerização da WireBeet.

3-2.5. Automontagem em agregados helicoidais

A formação da WireBeet em meio ácido aquoso ($[HCl] = 2 \text{ mmol L}^{-1}$) foi acompanhada por espectroscopia de absorção no UV-Vis a $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Para favorecer a formação da bisbetaxantina, foi utilizado um excesso de 4 equiv. de HBt em relação à *p*-fenilenodiamina. Na Figura 51a, a cinética monitorada por absorção no UV-Visível mostra o consumo do HBt ($\lambda = 418 \text{ nm}$) e a formação dos produtos da reação: *p*-NH₂-pBeet ($\lambda = 518 \text{ nm}$) e WireBeet ($\lambda = 583 \text{ nm}$). Para determinar as constantes cinéticas e acompanhar a evolução temporal dos espectros dos produtos formados e consumidos, a segunda derivada dos espectros de absorção foi calculada devido à sobreposição das bandas dos vários compostos formados, tornando todas as bandas positivas em bandas negativas mais bem resolvidas (Figura 51a superior).

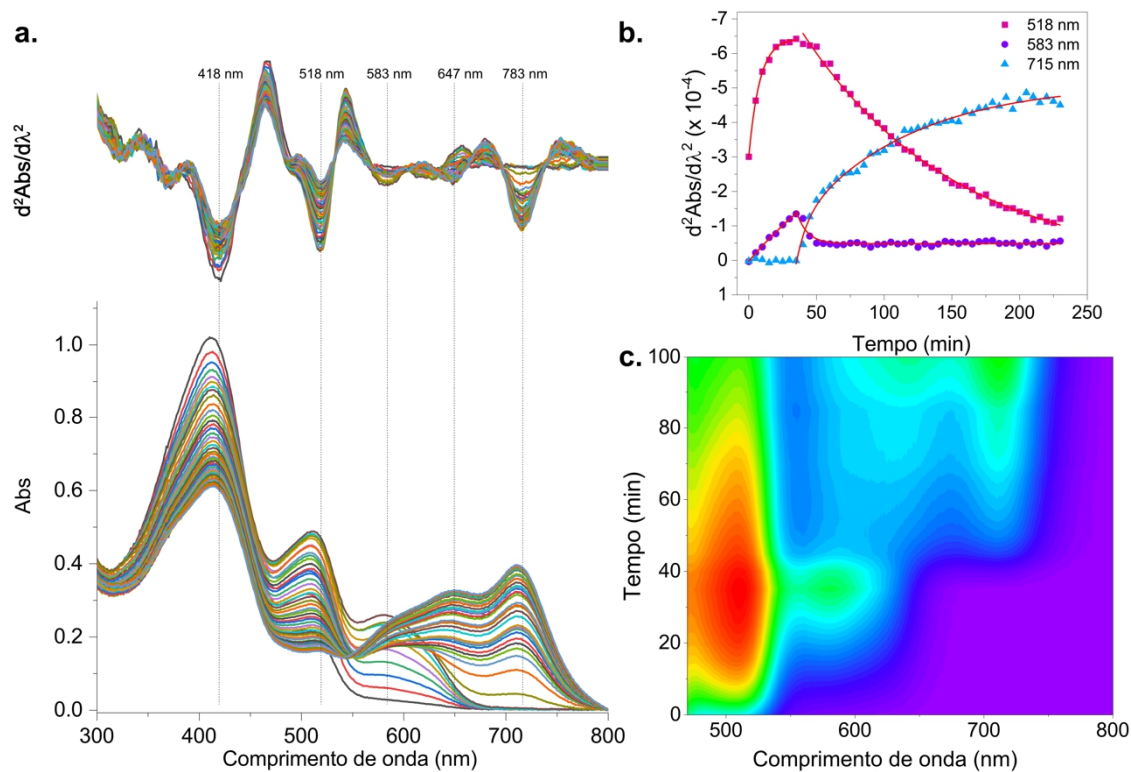


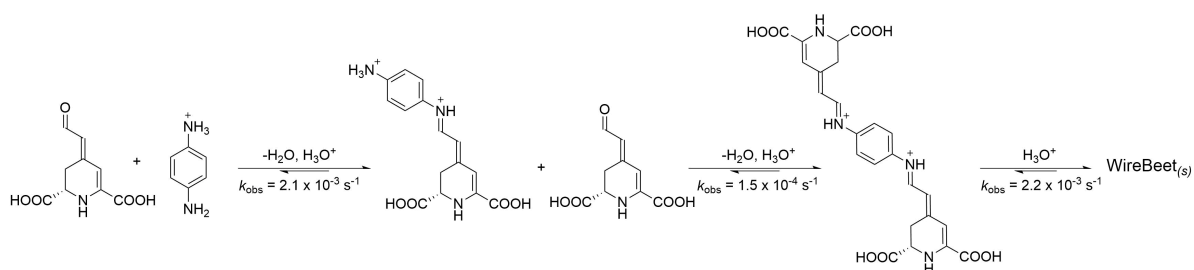
Figura 51. Cinética de formação de WireBeet em meio ácido aquoso. (a) Cinética acompanhada por absorção no UV-Vis da reação de formação de *p*-NH₂-pBeet/WireBeet realizada nas proporções de 1 equiv. de *p*-fenilenodiamina ([ppd] = 11 μmol L⁻¹) e 4 equív. de ácido betalâmico ([HBt] = 44 μmol L⁻¹) em H₂O acidificada com HCl ([HCl] = 2 mmol L⁻¹). Na parte superior da figura encontra-se os espectros de segunda derivada da cinética, os ruídos da segunda derivada foram atenuados com Savitzky-Golay Smooth; (b) Decaimentos cinéticos obtidos a partir do espectro resolvido por 2ª derivada, *p*-NH₂-pBeet (λ^{Abs} = 518 nm), monômero de WireBeet (λ^{Abs} = 583 nm), agregado de WireBeet (λ^{Abs} = 715 nm); (c) Recorte em 2D de região espectral e temporal de interesse da cinética de formação. T = 15 °C.

Tabela 16. Constantes cinéticas da reação de formação de *p*-NH₂-pBeet (518 nm) e WireBeet (583/715 nm).

	k_{obs1} / s^{-1}	k_{obs2} / s^{-1}
518 nm	$2,1 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-4}$
583 nm	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
715 nm	$2,2 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-4}$

Inicialmente, há a formação de uma banda em 518 nm, correspondente à *p*-NH₂-pBeet, com $k_{obs} = 2,1 \times 10^{-3} s^{-1}$ (os ajustes cinéticos a partir da segunda derivada estão apresentados na Figura 51b, Tabela 16). Adicionalmente, observa-se a formação de uma banda em 583 nm,

referente à WireBeet, que se forma mais lentamente do que a *p*-NH₂-pBeet ($k_{\text{obs}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). A *p*-NH₂-pBeet, monitorada em 518 nm, é formada e acumula-se por 35 min de reação, a partir do qual ela passa a ser majoritariamente consumida, com $k_{\text{obs}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Esse consumo da *p*-NH₂-pBeet está diretamente vinculado à sua participação na formação da WireBeet, que é formada na reação da *p*-fenilenodiamina com duas moléculas de ácido betalâmico através da adição sequencial das duas moléculas de ácido betalâmico à amina (Esquema 15). Também é possível que ocorra a adição simultânea das duas moléculas de HBt à *p*-fenilenodiamina, mas a constante de velocidade observada de consumo da *p*-NH₂-pBeet ser igual à constante de velocidade observada de formação da WireBeet é uma evidência do mecanismo sequencial.



Esquema 15. Reação de formação de *p*-NH₂-pBeet e WireBeet.

Após cerca de 40 minutos de reação, a banda em 583 nm é rapidamente alterada para a banda de absorção da WireBeet característica do meio ácido. O perfil cinético ajustado no máximo dessa banda em 715 nm mostra que não há aumento na absorção nessa região durante os primeiros 35 minutos de reação, a partir do qual o composto que absorve em 715 nm começa a ser formado ($k_{\text{obs}} = 2,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) e o que absorve em 583 nm é rapidamente consumido ($k_{\text{obs}} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Essa mudança repentina no espectro de absorção da WireBeet de cor roxa para azul pode ser visualizada com mais clareza na Figura 51c, que mostra o corte em 2D da evolução temporal da reação de conversão da WireBeet de roxa para azul. A mudança no espectro de absorção após determinada concentração de WireBeet ter sido atingida ($2,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) indica que outro processo ocorre além da formação da betalaína. Ao final da reação, esse composto azul formado é encontrado na forma de uma suspensão na solução aquosa, o que também é observado ao acidificar-se uma solução pura de WireBeet com a mesma concentração de ácido clorídrico. A formação de um sólido azul após a acidificação da WireBeet é um fenômeno atípico para betalaínas, que tendem a hidrolisar rapidamente em altas concentrações de íons H₃O⁺, e indica que a protonação da WireBeet induz a sua agregação até a formação de um sólido azul, o que é corroborado pelo deslocamento batocrômico do espectro de absorção.

Durante a reação de formação da WireBeet em meio aquoso ácido, essa agregação induzida por ácido é atingida após determinada concentração de WireBeet ter sido formada e é mantida no decorrer da reação.

A Figura 52a apresenta o espectro de absorção de uma solução aquosa de WireBeet e o seu espectro após acidificação com ácido clorídrico ($[\text{HCl}] = 2 \text{ mmol L}^{-1}$). A banda em 578 nm da betalaína em água converte-se em duas bandas sobrepostas, com menor largura de banda, e $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 648 \text{ nm}$ e 703 nm , alterando a cor da solução aquosa da betalaína de roxo para azul celeste. Esse deslocamento batocrômico dramático é tipicamente observado em agregados do tipo J, que ocorre, por exemplo, em corantes polimetínicos, como as cianinas.^[199,201,218] A existência de múltiplas bandas sobrepostas sugere a possibilidade de que diferentes empacotamentos do monômero nos agregados tenham sido formados^[219,220].

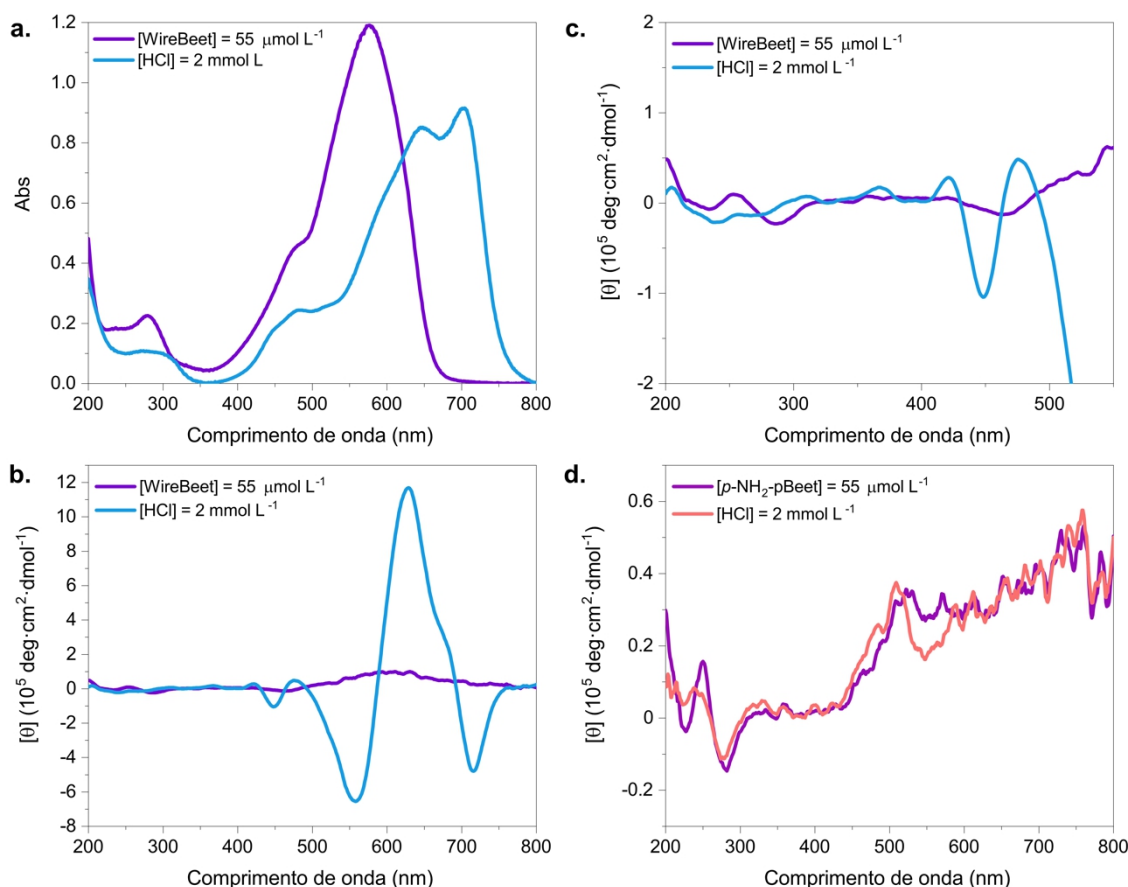


Figura 52. Agregação da WireBeet. (a). Espectro de absorção da WireBeet em meio aquoso e após a adição de HCl (concentração final = 2 mmol L^{-1}); (b) Espectro de dicroísmo circular da WireBeet em meio aquoso e após a adição de HCl (concentração final = 2 mmol L^{-1}); (c) destaque na região de 200 a 550 nm; (d) Espectro de dicroísmo circular da *p*-NH₂-pBeet em água e após adição de HCl (concentração final 2 mmol L^{-1}). [betalaína] = 55 μmol L^{-1} , caminho óptico = 2 mm .

Para investigar se as mudanças espectrais observadas com a acidificação da solução de WireBeet são consequência da sua automontagem resultando em agregados helicoidais, foi realizada uma análise por dicroísmo circular eletrônico (ECD). O espectro de ECD da WireBeet em meio neutro possui um conjunto de bandas de baixa intensidade em torno de 270 nm (Figura 52b e c, espectro roxo). O sinal observado é resultado da manutenção da configuração *S* dos carbonos quirais no anel 2,6-dicarboxi-2-piperidínio do ácido betalâmico proveniente da beterraba.

Após a acidificação da amostra, surge uma banda intensa de dicroísmo circular, com conjuntos de sinais de acoplamento de éxciton com alta intensidade (Figura 52b). Dois conjuntos de sinais com intensidades altas foram observados: (i) *primeiro efeito Cotton negativo* em $\lambda = 558$ nm e *segundo efeito Cotton positivo* em $\lambda = 630$ nm; (ii) *primeiro efeito Cotton positivo* em $\lambda = 686$ nm e *segundo efeito Cotton negativo* em $\lambda = 716$ nm. As bandas de efeito *Cotton* positivo dos dois acoplamentos excitônicos estão consideravelmente sobrepostas e foram resolvidas calculando-se a 2ª derivada do espectro. O espectro de dicroísmo circular indica a existência de dois conjuntos principais de agregados com quiralidades diferentes: o primeiro com *quiralidade éxciton negativa*, resultado de um agregado helicoidal no sentido anti-horário, enquanto o segundo possui *quiralidade de éxciton positiva*, resultado de um agregado com movimento horário. Adicionalmente, outros dois conjuntos de bandas de acoplamento excitônico com maior energia, intensidades muito menores e quiralidade negativa também foram observados, o que sugere a presença de agregados com diferentes estruturas supramoleculares ou tamanhos. A existência de conjuntos diferentes de agregados é condizente com o observado no espectro de absorção da solução de agregado, que possui pelo menos três bandas principais na região das transições $\pi-\pi^*$, e cujos máximos de absorção são iguais – ou muito próximos – ao cruzamento em $[\theta]$, conforme esperado.

Os espectros de dicroísmo circular da *p*-NH₂-pBeet nas mesmas condições experimentais também foram adquiridos como controle (Figura 52d). Assim como foi observado para a WireBeet em meio neutro, a *p*-NH₂-pBeet possui apenas o sinal de dicroísmo circular pertencente ao seu carbono assimétrico que tem configuração absoluta *S*. Não há alterações significativas no espectro em meio ácido, o que confirma que o acoplamento da segunda unidade de ácido betalâmico é fundamental para a formação de agregados de betalaína em meio ácido.

A morfologia dos agregados foi caracterizada por microscopia de transmissão eletrônica. Algumas imagens da microscopia em diferentes ampliações são apresentadas na Figura 53. As

imagens mostram a existência de nanofios curtos e finos, com espessura de cerca de 8-13 nm e polidispersos, além da presença de estruturas maiores e amorfas (primeira imagem).

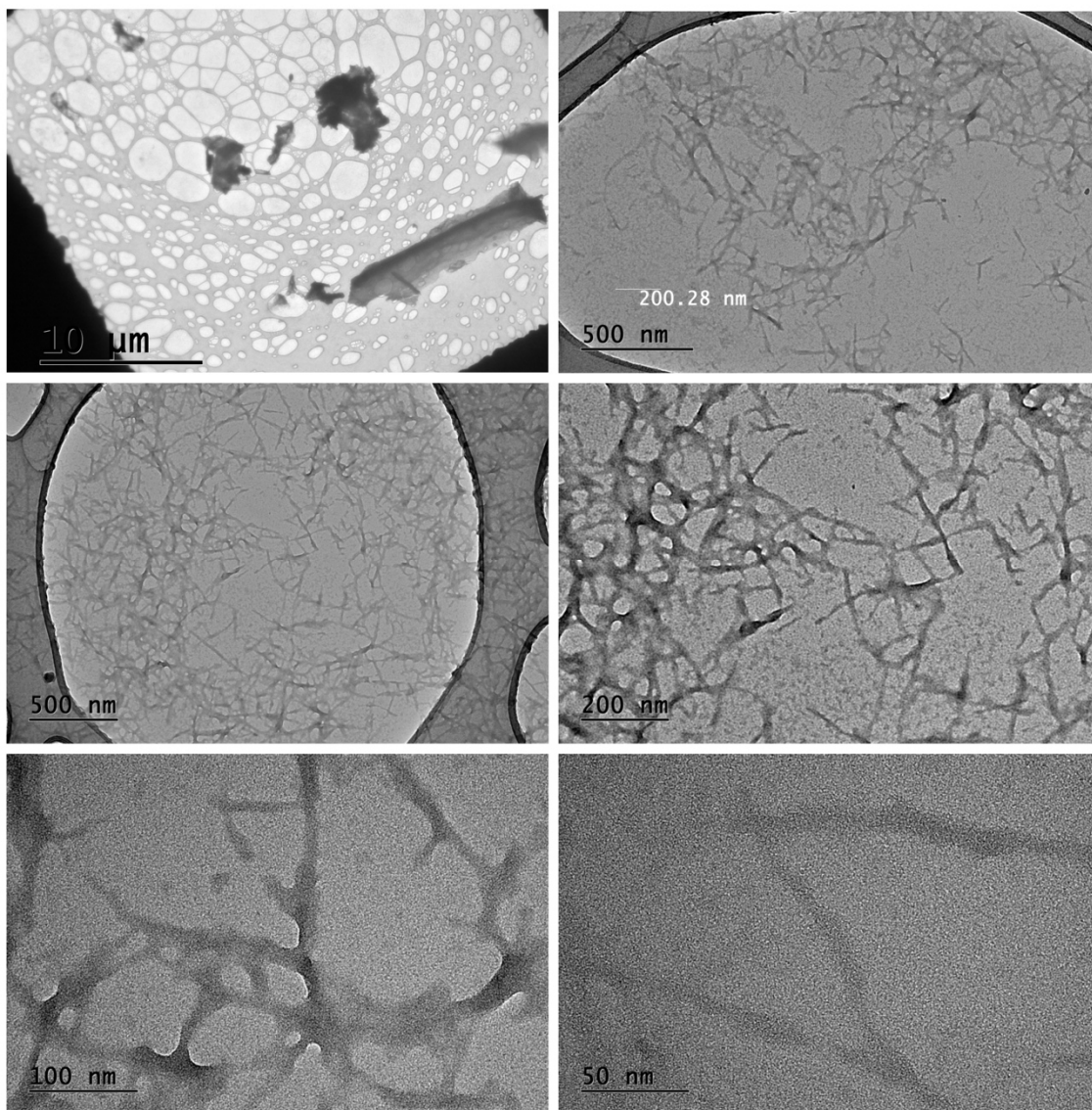


Figura 53. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do agregado de WireBeet. Nas três primeiras imagens, a região cinza mais escura nas bordas da imagem é a grade da medida.

As principais interações intermoleculares responsáveis pela automontagem da WireBeet são o empilhamento π , interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio. Essas últimas parecem desempenhar um papel fundamental para a formação das estruturas supramoleculares de WireBeet. O pK_a dos ácidos carboxílicos determinado para todas as betalainas presentes nessa tese é em torno de 2,6, valor próximo ao pK_a obtido na titulação da WireBeet. Esse valor correspondente à inflexão do pH necessário para que a agregação ocorra, o que sugere a sua dependência com a protonação dos ácidos carboxílicos da WireBeet. Adicionalmente, além de

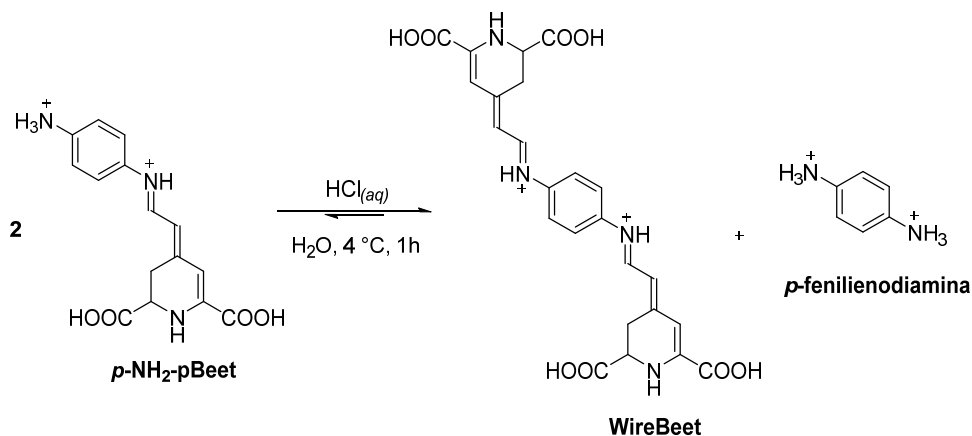
possibilitar ligações de hidrogênios intermoleculares, a protonação dos ácidos carboxílicos pode favorecer que os orbitais moleculares no estado fundamental da WireBeet tenham um caráter dipolar, favorecendo interações dipolo-dipolo na automontagem do nanofio.

3-3. Conclusões

A adição de uma segunda “unidade” de ácido betalâmico à *p*-NH₂-pBeet formando uma bis-betaxantina leva a uma molécula simétrica e com maior conjugação de cor roxa, mas que se torna azul em meio ácido por causa da agregação. Enquanto todas as betalaínas que conhecemos até hoje são consideravelmente instáveis em meio ácido, a diminuição do pH de solução de WireBeet provoca a sua automontagem em agregados com estrutura potencialmente helicoidal e organizada em nanofios. Esse é um exemplo de material obtido de fonte renovável que se estrutura espontaneamente em uma hélice quiral que encontra paralelo na química de ácidos nucleicos. Esse achado cria novas possibilidades para a criação de novos materiais termo e fotorresponsivos.

3-4. Parte experimental

3-4.1. Semissíntese de WireBeet



Uma solução aquosa de *p*-NH₂-pBeet pura (0,2 mmol L⁻¹) foi acidulada até pH 1,8 com um solução de HCl 1 mol L⁻¹ e mantida na geladeira (4 °C) por 1 h. A suspensão foi centrifugada (15 min, 10000 ×g, 5 °C), o sobrenadante foi removido e o sólido azul foi ressuspendido em água. Esse processo de lavagem e centrifugação foi repetido três vezes. O sólido azul resultante foi solubilizado em água e purificado por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20 com água como fase móvel. As frações roxas foram coletadas, reunidas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o uso. Rendimento: 30%.

3-4.2. HPLC-MS

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) alta resolução foram realizadas em um equipamento MAXIS 3G da Bruker Daltonics com ionização por *electrospray* em modo positivo e detecção q-TOF. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Supelco Ascentis C18 – 250 x 4.6 mm – 5 μm, como fase estacionária e a eluição foi realizada com um gradiente de 2% de B por 7 min, de 2 a 30% de B em 15 min e de 30 a 95% de B em 45 minutos com fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

3-4.3. Determinação do coeficiente de absorção molar

O coeficiente de absorção molar (ϵ) da WireBeet (WBt) foi calculado através do método do ponto final. A concentração inicial da betalaína é determinada a partir da sua completa conversão em HBt. O ϵ do ácido betalâmico é conhecido ($\epsilon_{424\text{nm}} = 27000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),^[92]

portanto a sua concentração pode ser determinada. Uma solução estoque de WireBeet foi adicionada a uma solução de tampão Britton-Robinson pH 5 e seu espectro de absorção foi registrado. Utilizando o a mesma diluição, WireBeet foi diluída em uma solução de tampão Britton-Robinson pH 8,5 e a cinética de decomposição da WireBeet foi monitorada em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio a 25 °C por 400 min, em cubetas de quartzo (volume final 1,0 mL e caminho óptico 10 mm). Ao término da cinética, o $\epsilon_{578\text{nm}}$ foi determinado correlacionando a concentração final de HBt com a concentração inicial da betalaína em pH 5, de acordo com a Eq. 15, derivada da lei de Lambert Beer. A formação de duas moléculas de HBt para cada molécula de WireBeet foi considerada no cálculo.

$$\epsilon_{578}^{WBt} = \frac{2 \cdot Abs_{t,pH 5}^{WBt} \cdot \epsilon_{424}^{HBt}}{Abs_{final}^{HBt}} \quad \text{Eq. 15}$$

$Abs_{final}^{HBt} = y_0$ no ajuste monoexponencial da formação de HBt acompanhada em 424 nm

3-4.4. Determinação de valores de pK_a

Alíquotas de 50 μL de uma solução de WireBeet ($46 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionadas a 450 μL de tampão Britton-Robinson com pH entre 2 e 12 em cubetas de quartzo de 1,5 mL e caminho ótico 10 mm e os espectros de absorção e emissão foram registrados imediatamente. As configurações do espectrofluorímetro Cary Eclipse Varian utilizadas na aquisição dos espectros de emissão foram: $\lambda^{\text{EX}} = 475 \text{ nm}$, intervalo de $\lambda^{\text{EM}} = 510\text{-}800 \text{ nm}$ e $\lambda^{\text{EX}} = 580 \text{ nm}$, intervalo de $\lambda^{\text{EM}} = 610\text{-}800 \text{ nm}$, com fendas de emissão e excitação = 20 nm, tensão = 600 V.

3-4.5. Cinética de formação de WireBeet em meio aquoso

A cinética da reação de formação de WireBeet foi realizada em meio aquoso. Em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm com volume final de 1,5 mL, soluções-estoque aquosas dos reagentes foram adicionadas nas proporções de 1 equiv. de *p*-fenilenodiamina ($[ppd]_{final} = 11 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 4 equiv. de ácido betalâmico ($[HBt]_{final} = 44 \mu\text{mol L}^{-1}$), em água acidificada com ácido clorídrico ($[HCl]_{final} = 2 \text{ mmol L}^{-1}$). A reação foi acompanhada através da aquisição de espectros de absorção em intervalos de 5 minutos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio termostaticado a 15 °C. Para melhor separação das bandas no tratamento de dados, a segunda derivada dos espectros de absorção foi calculada com o auxílio do software Origin, e os espectros foram atenuados com *Savitzky-Golay Smooth* (20 pontos). As constantes cinéticas foram determinadas pelo ajuste exponencial da absorção em função do tempo.

3-4.6. Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram adquiridos em cubeta de quartzo com caminho óptico de 2 mm em um Espectrômetro Jasco J-815 acoplado com um controlador de temperatura Peltier CDF-426S a 25 °C. A elipticidade (mdeg) determinada foi convertida em elipticidade molar ($[\theta]$, deg cm² dmol⁻¹) através da equação Eq. 16.

$$[\theta] = \frac{\theta(mdeg)}{10 \cdot C \left(\frac{mol}{L}\right) \cdot b(cm)} \quad \text{Eq. 16}$$

θ = elipticidade (mdeg)

C = concentração (mol L⁻¹)

b = caminho óptico (cm)

3-4.7. Microscopia de eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram adquiridas em um microscópico JEOL JEM 2100. À uma solução de aquosa de WireBeet, foi adicionado HCl (2 mmol L⁻¹). A solução de agregado formada foi centrifugada em tubos *eppendorf* (10 min, 10 000 ×g, 5 °C). O sobrenadante foi removido e o agregado ressuspenso em H₂O milli-Q. Essa solução do agregado foi gotejada (3 gotas de 2 μL) em uma grade de cobre (400 mesh) recoberta com carbono para microscopia, deixando-se secar em temperatura ambiente entre cada gota adicionada.

Página deixada em branco intencionalmente

Conclusões

O grupo aldeído presente no ácido betalâmico permite modular a estrutura de betalaínas, criando compostos com propriedades interessantes, que podem ampliar ou aprimorar as propriedades características de betalaínas, como a boa capacidade antioxidante e a modesta fluorescência. Entretanto, por serem iminas, betalaínas são altamente susceptíveis à hidrólise e, sendo solúveis principalmente em água, suas aplicações tornam-se limitadas devido à baixa estabilidade. O objetivo central dessa Tese de Doutorado foi, através de diferentes estratégias, ampliar o escopo de possibilidades de estabilização de betalaínas frente à hidrólise.

A primeira estratégia utilizada foi alterar o esqueleto principal trocando o grupo imina, presente em todas as betalaínas, por um grupo nitrona, o que pode ser feito de forma consideravelmente simples, pois envolve apenas a reação do ácido betalâmico com uma hidroxilamina substituída. A betalaína formada, denominada **OxiBeet**, mostra que a presença do grupo nitrona diminui a eletrofilicidade do carbono carbonílico aumentando a estabilidade frente à hidrólise em meio neutro e alcalino; até o momento, OxiBeet é a betalaína mais estável em meio alcalino reportada. Apesar da nitrona diminuir o rendimento quântico de fluorescência da OxiBeet em relação a pBeet, o que indica que, sozinha, ela não é a estratégia de escolha quando se quer uma betalaína muito fluorescente, a sua boa capacidade antioxidante é mantida, o que em conjunto com diferentes substituintes na porção fenila, pode resultar em antioxidantes mais potentes e mais estáveis. Como consequência da sua função nitrona, que possui um potencial de redução mais baixo do que o encontrado no seu análogo imina, um radical estabilizado pôde ser formado e caracterizado por EPR, permitindo futuras aplicações como captador de spin ou antioxidante biocompatível.

A segunda estratégia foi investigar como a mudança do ambiente químico em torno da betalaína, através da encapsulação em cucurbit[7]urila afeta a estabilidade hidrolítica. Dessa vez, duas betalaínas foram utilizadas como modelo, a fenil-betaxantina não

substituída **pBeet** e a fenil-betaxantina substituída com um grupo amino na posição *para* **p-NH₂-pBeet**. De fato, a proteção contra o ataque da água resultante da inclusão em CB7 aumenta a estabilidade de ambas betalaínas em meio ácido e neutro, possuindo maior extensão de estabilização em meio ácido, devido à maior afinidade de CB7 por espécies positivamente carregadas, como o nitrogênio imínico e o do grupo amino, que estão protonados em pH 2,5. A vantagem adicional do encapsulamento em CB7 é que, graças a restrição conformacional e vibracional que ela provoca, a fluorescência da *p*-NH₂-pBeet aumenta expressivamente. O estudo estrutura-propriedade, comparando as duas betalaínas em meio neutro e ácido, indica que a presença do grupo amino livre é fundamental para o aumento da fluorescência, o que está relacionado à afinidade entre os portais da CB7 e o nitrogênio do grupo amino livre protonado, seja em meio ácido, ou por protonação induzida pela inclusão, que aumenta o pK_a dos grupos ionizáveis dos compostos. A inclusão em cucurbit[7]urila demonstra ser uma boa opção quando se quer aumentar a estabilidade e a fluorescência de betalaínas.

Por fim, uma bis-betaxantina, denominada **WireBeet**, foi semissintetizada através do acoplamento entre a *p*-NH₂-pBeet e uma segunda molécula de ácido betalâmico, o que criou uma betalaína simétrica com porções betalâmicas nas duas pontas. A conjugação estendida resultou numa betalaína roxa, que não é muito mais estável do que a maioria das betalaínas em meio alcalino, mas que possui propriedades interessantes em meio ácido. Betalaínas são hidrolisadas rapidamente em meio muito ácido (pH 2), mas com a protonação dos ácidos carboxílicos, ao invés de se decompor, WireBeet forma um sólido azul. Estudos de dicroísmo circular e microscopia de transmissão eletrônica sugerem que ocorre a agregação em uma estrutura organizada quiral e helicoidal, fenômeno nunca observado em betalaínas.

Referências

- [1] R. S. Heath, R. E. Ruscoe, N. J. Turner, *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 335–388.
- [2] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, I. E. Orhan, M. Banach, J. M. Rollinger, D. Barreca, W. Weckwerth, R. Bauer, E. A. Bayer, M. Majeed, A. Bishayee, V. Bochkov, G. K. Bonn, N. Braidy, F. Bucar, A. Cifuentes, G. D’Onofrio, M. Bodkin, M. Diederich, A. T. Dinkova-Kostova, T. Efferth, K. El Bairi, N. Arkells, T. P. Fan, B. L. Fiebich, M. Freissmuth, M. I. Georgiev, S. Gibbons, K. M. Godfrey, C. W. Gruber, J. Heer, L. A. Huber, E. Ibanez, A. Kijjoo, A. K. Kiss, A. Lu, F. A. Macias, M. J. S. Miller, A. Mocan, R. Müller, F. Nicoletti, G. Perry, V. Pittalà, L. Rastrelli, M. Ristow, G. L. Russo, A. S. Silva, D. Schuster, H. Sheridan, K. Skalicka-Woźniak, L. Skaltsounis, E. Sobarzo-Sánchez, D. S. Brecht, H. Stuppner, A. Sureda, N. T. Tzvetkov, R. A. Vacca, B. B. Aggarwal, M. Battino, F. Giampieri, M. Wink, J. L. Wolfender, J. Xiao, A. W. K. Yeung, G. Lizard, M. A. Popp, M. Heinrich, I. Berindan-Neagoe, M. Stadler, M. Daglia, R. Verpoorte, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200–216.
- [3] S. B. Christensen, *Biomedicines* **2021**, *9*, DOI 10.3390/biomedicines9050472.
- [4] G. Karageorgis, D. J. Foley, L. Laraia, H. Waldmann, *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 227–235.
- [5] G. Karageorgis, D. J. Foley, L. Laraia, S. Brakmann, H. Waldmann, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60*, 15705–15723.
- [6] J. M. Gally, A. Pahl, P. Czodrowski, H. Waldmann, *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 5458–5468.
- [7] L. E. Contreras-Llano, M. A. Guerrero-Rubio, J. D. Lozada-Ramírez, F. García-Carmona, F. Gandía-Herrero, *MBio* **2019**, *10*, DOI 10.1128/mBio.00345-19.
- [8] L. C. P. Gonçalves, M. A. D. S. Trassi, N. B. Lopes, F. A. Dörr, M. T. Dos Santos, W. J. Baader, V. X. Oliveira, E. L. Bastos, *Food Chem.* **2012**, *131*, 231–238.
- [9] L. C. P. Gonçalves, A. C. Marcato, A. C. B. Rodrigues, A. P. E. Pagano, B. C. De Freitas, C. O. De Machado, K. K. Nakashima, L. C. Esteves, N. B. Lopes, E. L. Bastos, *Rev. Virtual Quim.* **2015**, *7*, 292–309.

- [10] F. C. Stintzing, a Schieber, R. Carle, *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 2302–2307.
- [11] S. Wybraniec, Y. Mizrahi, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6086–6089.
- [12] F. Gandía-Herrero, F. García-Carmona, J. Escribano, *Nature* **2005**, *437*, 334.
- [13] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *Planta* **2005**, *222*, 586–593.
- [14] G. F. Trezzini, J. P. Zrýd, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1897–1899.
- [15] A. Iriel, M. G. Lagorio, *Naturwissenschaften* **2010**, *97*, 915–924.
- [16] F. H. Quina, E. L. Bastos, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90*, 681–695.
- [17] D. M. M. Soares, C. P. Gonc, C. O. Machado, L. C. Esteves, C. V Stevani, C. C. Oliveira, A. D. Felipe, E. Pinto, M. M. Adachi, C. T. Hotta, E. L. Bastos, **2022**, DOI 10.1021/acsomega.2c01365.
- [18] W. Schliemann, N. Kobayashi, D. Strack, *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1217–1232.
- [19] K. K. Nakashima, E. L. Bastos, *Antioxidants* **2019**, *8*, 222.
- [20] L. C. P. Gonçalves, N. B. Lopes, F. A. Augusto, R. M. Pioli, C. O. Machado, B. C. Freitas-Dörr, H. B. Suffredini, E. L. Bastos, *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92*, 243–253.
- [21] T. Nilsson, *Lantbrukshoegskolans Ann.* **1970**, *36*, 179–219.
- [22] L. C. Esteves, A. C. Pinheiro, R. M. Pioli, T. C. Penna, W. J. Baader, T. C. Correra, E. L. Bastos, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 853–864.
- [23] S. A. Rodriguez, M. T. Baumgartner, *ACS Omega* **2020**, *5*, 13751–13759.
- [24] M. Spiegel, A. Gamian, Z. Sroka, *Molecules* **2021**, *26*, 1–20.
- [25] E. L. Bastos, W. Schliemann, in *Plant Antioxidants Heal.* (Eds.: H.M. Ekiert, K.G. Ramawat, J. Arora), Springer International Publishing, Cham, **2021**, pp. 1–44.
- [26] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *Planta* **2010**, *232*, 449–460.
- [27] I. B. Slimen, T. Najar, M. Abderrabba, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 675–689.
- [28] L. C. P. Gonçalves, N. B. Lopes, F. A. Augusto, R. M. Pioli, C. O. Machado, B. C. Freitas-Dörr, H. B. Suffredini, E. L. Bastos, *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92*, 243–253.
- [29] A. Kumorkiewicz, N. Szmyr, U. Popena, Z. Pietrkowski, S. Wybraniec, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 7455–7465.
- [30] L. Tesoriere, M. Allegra, D. Butera, M. A. Livrea, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 941–945.
- [31] L. Tesoriere, A. Attanzio, M. Allegra, C. Gentile, M. a Livrea, *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 415–423.
- [32] F. Naselli, L. Tesoriere, F. Caradonna, D. Bellavia, A. Attanzio, C. Gentile, M. A. Livrea, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 652–658.
- [33] D. L. A. Fernandes, C. Paun, M. V. Pavliuk, A. B. Fernandes, E. L. Bastos, J. Sá, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 95693–95697.

- [34] J. Kou, R. S. Varma, *RSC Adv.* **2012**, 2, 10283.
- [35] A. B. Fernandes, M. V. Pavliuk, C. Paun, A. C. Carvalho, C. S. Nomura, E. Lewin, R. Lindblad, P. H. C. Camargo, J. Sá, E. L. Bastos, *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, DOI 10.1021/acsanm.9b02433.
- [36] S. A. Kosa, Z. Zaheer, *Food Chem.* **2019**, 298, 125014.
- [37] A. B. Fernandes, *Uso de Compostos Betaláinicos Na Síntese e Modulação Das Características de Betaláinas*, USP, **2021**.
- [38] M. V. Pavliuk, A. B. Fernandes, M. Abdellah, D. L. A. Fernandes, C. O. Machado, I. Rocha, Y. Hattori, C. Paun, E. L. Bastos, J. Sá, *Sci. Rep.* **2017**, 7, DOI 10.1038/s41598-017-09261-7.
- [39] M. Wendel, A. Kumorkiewicz, S. Wybraniec, M. Ziółek, G. Burdziński, *Dye. Pigment.* **2017**, 141, 306–315.
- [40] C. I. Oprea, A. Dumbravă, I. Enache, A. Georgescu, M. a. Gîrțu, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2012**, 240, 5–13.
- [41] L. C. P. Gonçalves, R. R. Tonelli, P. Bagnaresi, R. A. Mortara, A. G. Ferreira, E. L. Bastos, *PLoS One* **2013**, 8, e53874.
- [42] A. C. B. Rodrigues, I. de F. A. Mariz, E. M. S. Maçoas, R. R. Tonelli, J. M. G. Martinho, F. H. Quina, E. L. Bastos, *Dye. Pigment.* **2018**, 150, 105–111.
- [43] K. M. Herbach, F. C. Stintzing, R. Carle, *J. Food Sci.* **2006**, 71, 41–50.
- [44] A. R. Fersht, A. J. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 5826–5832.
- [45] J. H. von Elbe, I.-Y. Maing, C. H. Amundson, *J. Food Sci.* **1974**, 39, 334–337.
- [46] Y. Cai, M. Sun, W. Schliemann, H. Corke, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4429–4435.
- [47] K. M. Herbach, F. C. Stintzing, R. Carle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 2603–2616.
- [48] K. M. Herbach, F. C. Stintzing, R. Carle, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 390–398.
- [49] L. C. P. Gonçalves, B. M. Di Genova, F. A. Dörr, E. Pinto, E. L. Bastos, *J. Food Eng.* **2013**, 118, 49–55.
- [50] L. C. P. Gonçalves, B. M. Di Genova, F. A. Dörr, E. Pinto, E. L. Bastos, *J. Food Eng.* **2013**, 118, 49–55.
- [51] J. H. Pasch, J. H. von Elbe, *J. Food Sci.* **1975**, 40, 1145–1147.
- [52] M. I. Khan, *Food Chem.* **2016**, 197, 1280–1285.
- [53] J. H. von Elbe, E. L. Attoe, *Food Chem.* **1985**, 16, 49–67.
- [54] J. Cabanes, F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, M. Jiménez-Atiénzar, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 3776–3782.

- [55] Y. Z. Cai, H. Corke, *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1248–1252.
- [56] F. Gandía-Herrero, J. Cabanes, J. Escribano, F. García-Carmona, M. Jiménez-Atiéndzar, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4294–4302.
- [57] F. Gandía-Herrero, M. Jiménez-Atiéndzar, J. Cabanes, F. García-Carmona, J. Escribano, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10646–10652.
- [58] W. Schliemann, D. Strack, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 585–588.
- [59] S. Heuer, S. Richter, J. W. Metzger, V. Wray, M. Nimtzt, D. Strack, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 761–767.
- [60] B. C. Freitas-Dörr, C. O. Machado, A. C. Pinheiro, A. B. Fernandes, E. Pinto, M. Abdellah, L. C. Russo, F. L. Forti, L. Bastos, *Sci. Adv.* **2020**, *5*.
- [61] A. Huang, J. von Elbe, *J. Food Sci.* **1983**, *50*, 1115–1120.
- [62] R. M. Pioli, R. R. Mattioli, L. C. Esteves, S. Dochev, E. L. Bastos, *Dye. Pigment.* **2020**, *183*, DOI 10.1016/j.dyepig.2020.108609.
- [63] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.
- [64] R. W. Layer, *Chem. Rev.* **1963**, *63*, 489–510.
- [65] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 832–837.
- [66] M. E. Belowich, J. F. Stoddart, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- [67] I. Huc, J. Lehn, *Virtual Combinatorial Libraries: Dynamic Generation of Molecular and Supramolecular Diversity by Self-Assembly*, **1997**.
- [68] J. M. Lehn, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 2836–2850.
- [69] E. Mattia, S. Otto, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 111–119.
- [70] A. J. Gallant, M. J. MacLachlan, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 5307–5310.
- [71] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481.
- [72] G. G. Spence, E. C. Taylor, O. Buchardt, *Chem. Rev.* **1970**, *70*, 231–265.
- [73] R. T. Kalia, J.; Raines, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.
- [74] I. Fleming, *Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions*, John Wiley & Sons, Inc, **2011**.
- [75] W. M. Haynes, D. R. Lide, T. J. Bruno, *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **2016**.
- [76] S.-I. Murahashi, Y. Imada, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 4684–4716.
- [77] M. J. Davies, *Methods* **2016**, *109*, 21–30.
- [78] G. Durand, M. Rosselin, P.-A. Klein, K. Zéamari, F. Choteau, B. Tuccio, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 135–142.

- [79] F. Peyrot, K. Abbas, N. Babic, **2016**, *109*, 31–43.
- [80] R. A. Floyd, R. D. Kopke, C. H. Choi, S. B. Foster, S. Doblaz, R. A. Towner, *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1361–1374.
- [81] C. Oliveira, S. Benfeito, C. Fernandes, F. Cagide, T. Silva, F. Borges, *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*, DOI 10.1002/med.21461.
- [82] J. Marco-Contelles, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 13413–13427.
- [83] E. G. Bagryanskaya, O. A. Krumkacheva, M. V Fedin, S. R. A. Marque, in *Electron Paramagn. Reson. Investig. Biol. Syst. by Using Spin Labels, Spin Probes, Intrinsic Met. Ions, Part A* (Eds.: P.Z. Qin, K.B.T.-M. in E. Warncke), Academic Press, **2015**, pp. 365–396.
- [84] T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 531–541.
- [85] A. J. Waldman, T. L. Ng, P. Wang, E. P. Balskus, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5784–5863.
- [86] L. Socrier, M. Rosselin, A. M. Gomez Giraldo, B. Chantemargue, F. Di Meo, P. Trouillas, G. Durand, S. Morandat, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2019**, *1861*, 1489–1501.
- [87] W. Schliemann, N. Kobayashi, D. Strack, *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 1217–1232.
- [88] F. C. Stintzing, F. Kugler, R. Carle, J. Conrad, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 1008–1016.
- [89] S. Wybraniec, B. Nowak-Wydra, Y. Mizrahi, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1725–1728.
- [90] F. C. Stintzing, J. Conrad, I. Klaiber, U. Beifuss, R. Carle, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 415–422.
- [91] R. M. Pioli, Efeito Da Modificação Da Porção Imínica de Betalaínas Sobre as Suas Propriedades Eletrônicas, Universidade de São Paulo, **2018**.
- [92] F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1030–1036.
- [93] W. Schliemann, Y. Cai, T. Degenkolb, J. Schmidt, H. Corke, *Phytochemistry* **2001**, *58*, 159–165.
- [94] M. Piattelli, L. Minale, G. Prota, *Tetrahedron* **1964**, *20*, 2325–2329.
- [95] A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- [96] M. Wendel, S. Nizinski, D. Tuwalska, K. Starzak, D. Szot, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 18152–18158.
- [97] M. Wendel, S. Nizinski, D. Tuwalska, K. Starzak, D. Szot, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 18152–18158.
- [98] J. E. Johnson, N. M. Morales, A. M. Gorczyca, D. D. Dolliver, M. A. McAllister, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7979–7985.
- [99] S. Niziński, Ł. Popena, M. F. Rode, A. Kumorkiewicz, Z. Fojud, E. Paluch-Lubawa, S.

- Wybraniec, G. Burdziński, *New J. Chem.* **2019**, *43*, 18165–18174.
- [100] D. V. Grishin, D. D. Zhdanov, M. V. Pokrovskaya, N. N. Sokolov, *Front. Life Sci.* **2020**, *13*, 11–22.
- [101] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- [102] M. C. Foti, R. Amorati, *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 1435–1448.
- [103] Í. Gulcin, *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 651–715.
- [104] I. Belhadj Slimen, T. Najar, M. Abderrabba, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, acs.jafc.6b04208.
- [105] J. W. Darcy, B. Koronkiewicz, G. A. Parada, J. M. Mayer, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2391–2399.
- [106] J. J. Warren, T. A. Tronic, J. M. Mayer, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6961–7001.
- [107] D. R. Weinberg, C. J. Gagliardi, J. F. Hull, C. F. Murphy, C. A. Kent, B. C. Westlake, A. Paul, D. H. Ess, D. Granville, T. J. Meyer, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4016–4093.
- [108] O. Ouari, M. Hardy, H. Karoui, P. Tordo, in *Electron Paramagn. Reson. Vol. 22*, The Royal Society Of Chemistry, **2010**, pp. 1–40.
- [109] T. Esatbeyoglu, A. E. Wagner, R. Motafakkerazad, Y. Nakajima, S. Matsugo, G. Rimbach, *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *73*, 119–126.
- [110] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [111] X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7794–7839.
- [112] A. Matencio, M. A. Guerrero-Rubio, F. Gandía-Herrero, F. García-Carmona, J. M. López-Nicolás, *Food Hydrocoll.* **2021**, *110*, DOI 10.1016/j.foodhyd.2020.106176.
- [113] P. Tutunchi, L. Roufegarinejad, H. Hamishehkar, A. Alizadeh, *Food Chem.* **2019**, *297*, 124994.
- [114] W. A. Freeman, W. L. Mock, N. Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367–7368.
- [115] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870.
- [116] E. Masson, X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah, X. Lu, *Cucurbituril Chemistry: A Tale of Supramolecular Success*, **2012**.
- [117] A. E. Kaifer, in *Cucurbituril-Based Funct. Mater.* (Ed.: D. Tuncel), Royal Society Of Chemistry, **2020**, pp. 40–55.
- [118] A. Koc, D. Tuncel, in *Cucurbituril-Based Funct. Mater.* (Ed.: D. Tuncel), Royal Society Of Chemistry, **2020**, pp. 7–39.
- [119] N. Vallavoju, J. Sivaguru, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4084.

- [120] W. M. Nau, M. Florea, K. I. Assaf, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 559–577.
- [121] R. Wang, L. Yuan, D. H. Macartney, *Chem. Commun.* **2005**, 5867–5869.
- [122] N. Basílio, S. Gago, A. J. Parola, F. Pina, *ACS Omega* **2017**, *2*, 70–75.
- [123] C. Marquez, W. M. Nau, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 3155–3160.
- [124] L. Isaacs, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 578–591.
- [125] W. S. Jeon, K. Moon, S. H. Park, H. Chun, Y. H. Ko, J. Y. Lee, E. S. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, M. V. Rekharsky, V. Sindelar, D. Sobransingh, Y. Inoue, A. E. Kaifer, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12984–12989.
- [126] M. Shaikh, J. Mohanty, P. K. Singh, W. M. Nau, H. Pal, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 408–414.
- [127] H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, C. Bohne, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623–20633.
- [128] P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 238–250.
- [129] M. Freitag, L. Gundlach, P. Piotrowiak, E. Galoppini, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3358–3366.
- [130] W. Gong, J. Ma, Z. Zhao, F. Gao, F. Liang, H. Zhang, S. Liu, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 3298–3301.
- [131] J. J. Alcázar, N. Geue, V. Valladares, A. Cañete, E. G. Pérez, L. García-Río, J. G. Santos, M. E. Aliaga, *ACS Omega* **2021**, *6*, 10333–10342.
- [132] V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2037–2042.
- [133] S. S. Thomas, H. Tang, C. Bohne, **2019**, DOI 10.1021/jacs.9b03691.
- [134] S. Yi, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10275–10278.
- [135] B. Held, H. Tang, P. Natarajan, C. P. Da Silva, V. De Oliveira Silva, C. Bohne, F. H. Quina, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 752–757.
- [136] D. Brynn Hibbert, P. Thordarson, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12792–12805.
- [137] P. Thordarson, in *Supramol. Chem.*, **2012**.
- [138] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.
- [139] A. M. de la Peña, F. Salanas, M. J. Gómez, M. I. Acedo, M. S. Peña, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1993**, *15*, 131–143.
- [140] C. N. Sanramé, R. H. De Rossi, G. A. Argüello, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 8151–8156.
- [141] S. Nigam, G. Durocher, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 7135–7142.
- [142] A. E. Hargrove, Z. Zhong, J. L. Sessler, E. V. Anslyn, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 348–354.
- [143] D. H. Macartney, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600–615.

- [144] R. Wang, D. Bardelang, M. Waite, K. A. Udachin, D. M. Leek, K. Yu, C. I. Ratcliffe, J. A. Ripmeester, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2435–2439.
- [145] K. Baranowska, M. Mońska, A. Kowalczyk, N. Szpakowska, Z. Kaczyński, P. Bojarski, M. Józefowicz, *J. Mol. Liq.* **2020**, *318*, DOI 10.1016/j.molliq.2020.113921.
- [146] W. Ong, A. E. Kaifer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42*, 2164–2167.
- [147] E. A. Kovalenko, D. A. Mainichev, *Appl. Magn. Reson.* **2015**, *46*, 281–293.
- [148] Y. Jang, R. Natarajan, Y. H. Ko, K. Kim, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 1003–1007.
- [149] M. Dračinský, C. S. Hurtado, E. Masson, J. Kaleta, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 2132–2135.
- [150] R. Poduval, K. Kurzatowska, M. Stobiecka, W. F. A. Dehaen, W. Dehaen, H. Radecka, J. Radecki, *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 413–419.
- [151] M. Novak, G. A. Bonham, J. J. Mulero, M. Pelecanou, J. N. Zemis, J. M. Buccigross, T. C. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4447–4456.
- [152] I. R. Bellobono, G. Favini, *Tetrahedron* **1968**, *25*, 57–71.
- [153] A. I. Lazar, J. Rohacova, W. M. Nau, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 11390–11398.
- [154] S. S. Thomas, C. Bohne, *Faraday Discuss.* **2015**, *185*, 381–398.
- [155] J. N. Martins, J. C. Lima, N. Basílio, *Molecules* **2021**, *26*, DOI 10.3390/molecules26010106.
- [156] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, in *Mol. Fluoresc. Princ. Appl.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**, pp. 141–179.
- [157] D. H. Macartney, *Isr. J. Chem.* **2018**, *58*, 230–243.
- [158] P. L. Fernandez, A. S. Murkin, *Molecules* **2020**, *25*, 1–18.
- [159] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem* **1960**, *64*, 188–190.
- [160] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology 2nd Ed. (the “Gold Book”)*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- [161] W. P. Jencks, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 425–432.
- [162] C. A. Bunton, V. J. Shiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3207–3214.
- [163] T. Clark, J. Heske, T. D. Kühne, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 2461–2465.
- [164] R. C. Hardy, R. L. Cottington, *J. Res. Natl. Bur. Stand. (1934)*. **1949**, *42*, 573.
- [165] M. Wendel, S. Nizinski, D. Tuwalska, K. Starzak, D. Szot, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 18152–18158.
- [166] M. Wendel, S. Nizinski, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2017**, *332*, 602–610.
- [167] S. Niziński, M. Wendel, M. F. Rode, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G.

- Burdziński, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 6411–6421.
- [168] M. Wendel, D. Szot, K. Starzak, D. Tuwalska, J. Gapinski, R. Naskrecki, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *J. Lumin.* **2015**, *167*, 289–295.
- [169] M. Wendel, D. Szot, K. Starzak, D. Tuwalska, D. Prukala, T. Pedzinski, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *Dye. Pigment.* **2015**, *113*, 634–639.
- [170] E. I. Alarcon, M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. Garcia, E. A. Lissi, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 269–273.
- [171] A. L. Koner, W. M. Nau, *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 55–66.
- [172] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980.
- [173] G. V. Zakharova, V. G. Avakyan, V. P. Markelov, N. L. Svyatoslavskii, T. A. Svyatoslavskaya, A. K. Chibisov, *High Energy Chem.* **2015**, *49*, 407–414.
- [174] M. Wendel, D. Szot, K. Starzak, D. Tuwalska, J. Gapinski, R. Naskrecki, D. Prukala, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdzinski, *J. Lumin.* **2015**, *167*, 289–295.
- [175] S. Niziński, M. Wendel, M. F. Rode, D. Prukała, M. Sikorski, S. Wybraniec, G. Burdziński, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 6411–6421.
- [176] C. T. L. Chan, C. C. W. Cheng, K. Y. F. Ho, W. M. Kwok, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 16306–16313.
- [177] Y. Han, L. H. Spangler, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1701–1707.
- [178] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Singapore, **2006**.
- [179] A. Rosspeintner, B. Lang, E. Vauthey, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 247–271.
- [180] J. J. Snellenburg, S. Laptinok, R. Seger, K. M. Mullen, I. H. M. van Stokkum, *J. Stat. Softw.* **2012**, *49*, 1–22.
- [181] J. S. Beckwith, C. A. Rumble, E. Vauthey, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2020**, *39*, 135–216.
- [182] I. H. M. Van Stokkum, D. S. Larsen, R. Van Grondelle, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2004**, *1657*, 82–104.
- [183] E. L. Bastos, S. M. Da Silva, W. J. Baader, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4432–4439.
- [184] O. A. El Seoud, W. J. Baader, E. L. Bastos, *Practical Chemical Kinetics in Solution*, **2016**.
- [185] S. Tshepelevitsh, A. Kütt, M. Lõkov, I. Kaljurand, J. Saame, A. Heering, P. G. Plieger, R. Vianello, I. Leito, *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 6735–6748.
- [186] N.-S. Cheng, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 3285–3288.
- [187] A. C. B. Rodrigues, Betalaínas CBeet e CsBeet: Semissíntese, Propriedades Fotofísicas e Interações Intermoleculares, Universidade de São Paulo, **2017**.
- [188] S. Sasaki, G. P. C. Drummen, G. I. Konishi, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2731–2743.

- [189] G. J. Zhao, K. L. Han, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 8914–8918.
- [190] J. Cao, C. Hu, F. Liu, W. Sun, J. Fan, F. Song, S. Sun, X. Peng, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 1601–1608.
- [191] A. T. R. Williams, S. A. Winfield, J. N. Miller, *Analyst* **1983**, *108*, 1067–1071.
- [192] G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 2366–2393.
- [193] I. Imaz, D. Maspoch, in *Supramol. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [194] D. B. Varshey, J. R. G. Sander, T. Friščić, L. R. MacGillivray, in *Supramol. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [195] M. F. Geer, L. S. Shimizu, in *Supramol. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [196] George M. Whitesides, Bartosz Grzybowski, *Science (80-.)*. **2002**, *295*, 2418–2421.
- [197] A. P. H. J. Lee, C. C. ; Grenier, C.; Meijer, E. W.; Schenning, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 671–683.
- [198] B. D. Wilts, H. M. Whitney, B. J. Glover, U. Steiner, S. Vignolini, *Mater. Today Proc.* **2014**, *1*, 177–185.
- [199] J. L. Bricks, Y. L. Slominskii, I. D. Panas, A. P. Demchenko, *Methods Appl. Fluoresc.* **2018**, *6*, DOI 10.1088/2050-6120/aa8d0d.
- [200] W. P. Bricker, J. L. Banal, M. B. Stone, M. Bathe, *J. Chem. Phys.* **2018**, *149*, DOI 10.1063/1.5036656.
- [201] F. Würthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Möller, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 3376–3410.
- [202] C. Reichardt, *J. Phys. Org. Chem.* **1995**, *8*, 761–773.
- [203] F. R. Keene, in *Supramol. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [204] N. Berova, G. A. Ellestad, N. Harada, *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* **2010**, *9*, 91–146.
- [205] N. Berova, N. Harada, K. Nakanishi, in *Encycl. Spectrosc. Spectrom.*, **1999**, pp. 542–558.
- [206] G. Gottarelli, S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chirality* **2008**, *20*, 471–485.
- [207] H. Von Berlepsch, S. Kirstein, C. Böttcher, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9646–9654.
- [208] E. Yashima, N. Ousaka, D. Taura, K. Shimomura, T. Ikai, K. Maeda, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13752–13990.
- [209] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [210] N. R. Babij, E. O. McCusker, G. T. Whiteker, B. Canturk, N. Choy, L. C. Creemer, C.

- V. D. Amicis, N. M. Hewlett, P. L. Johnson, J. A. Knobelsdorf, F. Li, B. A. Lorsbach, B. M. Nugent, S. J. Ryan, M. R. Smith, Q. Yang, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 661–667.
- [211] N. Onishi, M. Z. Ertem, S. Xu, A. Tsurusaki, Y. Manaka, J. T. Muckerman, E. Fujita, Y. Himeda, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 988–992.
- [212] A. C. Pinheiro, R. B. Fazzi, L. C. Esteves, C. Oliveira, F. A. Dörr, E. Pinto, Y. Hattori, J. Sa, A. Maria, E. L. Bastos, *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *168*, 110–116.
- [213] L. C. P. Gonçalves, Betalaínas: Semissíntese, Capacidade Antirradicalar e Aplicação Como Sondas Em Sistemas Biológicos, Universidade Federal do ABC, **2012**.
- [214] M. R. V. Sahyun, J. T. Blair, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1997**, *104*, 179–187.
- [215] Z. Wang, S. Chu, S. Wang, Q. Gong, *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 1–5.
- [216] A. Weigel, M. Pfaffe, M. Sajadi, R. Mahrwald, R. Improta, V. Barone, D. Polli, G. Cerullo, N. P. Ernsting, F. Santoro, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 13350–13364.
- [217] P. A. Hunt, M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5720–5726.
- [218] V. V. Egorov, *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, DOI 10.1098/rsos.160550.
- [219] S. Kirstein, S. Daehne, *Int. J. Photoenergy* **2006**, *2006*, 1–21.
- [220] H. V. Berlepsch, K. Ludwig, S. Kirstein, C. Böttcher, *Chem. Phys.* **2011**, *385*, 27–34.
- [221] I. G. R. Gutz, **2018**.

Página deixada em branco intencionalmente

Súmula Curricular

I DADOS PESSOAIS

Nome: Amanda Capistrano Pinheiro

Local e data de nascimento: São Bernardo de Campo - SP, 10 de maio de 1993

II EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015 Bacharela em Química

III FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Escola Técnica Estadual Júlio de Mesquita, Santo André, 2010, Técnica em Química

IV ATIVIDADES ACADÊMICAS

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

Período	1º semestre/2015
Disciplina	QFL0350 – Química Orgânica
Curso de graduação	Bacharelado em Ciências Biomédicas
Supervisor	Prof. Dr. Erick Leite Bastos
Período 02/2016 – 06/2016	1º semestre/2016 (Bolsista PAE)
Disciplina	QFL1221– Estrutura e Propriedades de Compostos Orgânicos
Curso de graduação	Bacharelado em Química
Supervisor	Prof. Dr. Josef W. Baader e Prof. Dr. Cassius V. Stevani

V. PUBLICAÇÕES

V. I. Artigos completos publicados em periódicos

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 nitrene precursor to a stabilized

nitroxide radical. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 168, p. 110-116, 2021.

Freitas-Dörr, B. C.; Machado, C. O.; Pinheiro, A. C.; Fernandes, A. B.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Lopes-Ferreira, M.; Abdellah, M.; Sá, J.; Russo, L. C.; Forti, F. L.; Gonçalves, L. C. P.; Bastos, E. L.. A metal-free blue chromophore derived from plant pigments. *Science Advances*, v. 6, p. eaaz0421, 2020.

Pinheiro, A. C.; Gonçalves, A.; Baader, W.; Yamaguchi, L.; Malek, N.; Bastos, E.; Seoud, O.. Biofuels from coconut fat and soybean oil: microwave-assisted synthesis and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Química Nova*, v. 41, p. 1200-1204, 2018.

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. *Photochemistry and Photobiology*, v. 94, p. 853-864, 2018.

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

PINHEIRO, A. C.; BASTOS, E. L.. Water-soluble self-assembling betalain rotaxanes. In: Suprachem, 2019, Würzburg. Suprachem - Book of abstracts, 2019. p. 124.

PINHEIRO, A. C.; BASTOS, E. L. Semisynthesis and photophysical properties of hydrolytic-stable betalains. In: 46th World Chemistry Congress/40a Reunião Anual da SBQ/ IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo. Technical papers. São Paulo: IUPAC/SBQ, 2017. p. 1881.

PINHEIRO, A. C.; GONCALVES, A. B. ; BAADER, W. J. ; BASTOS, E. L. ; YAMAGUCHI, L. F. ; MALEK, N. I. ; EL SEOUD, O. A. . Education for sustainable development in the undergraduate laboratory: Microwave-assisted synthesis of biodiesel fuels from coconut fat and soybean oil and their analysis by gas chromatography/mass spectrometry. In: 46th World Chemistry Congress/40a Reunião Anual da SBQ/ IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo. Technical papers. São Paulo: IUPAC/SBQ, 2017. p. 1713.

PIOLI, R. M. ; DOOR, B. C. F. ; PINHEIRO, A. C. ; RODRIGUES, A. C. B. ; FERNANDES, A. B. ; BAADER, W. J. ; BASTOS, E. L. . Substituent effects on the rate of hydrolysis and photophysical properties of phenylbetalains. In: 46th World Chemistry Congress/40a Reunião Anual da SBQ/ IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo. Technical papers. São Paulo: IUPAC/SBQ, 2017. p. 1882.

MACHADO, C. O. ; DOOR, B. C. F. ; RODRIGUES, A. C. B. ; PINHEIRO, A. C. ; ABDELAH, M. ; SA, J. ; BASTOS, E. L. . Structure-photophysical properties relationship of synthetic betalains. In: 46th World Chemistry Congress/40a Reunião Anual da SBQ/ IUPAC 49th General Assembly, 2017, São Paulo. Technical papers. São Paulo: IUPAC/SBQ, 2017. p. 1670.

PINHEIRO, A. C.; BASTOS, E. L. . Estudo da copigmentação de betalainas. In: 37ª Reunião

Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal, 2014. v. FOT017.

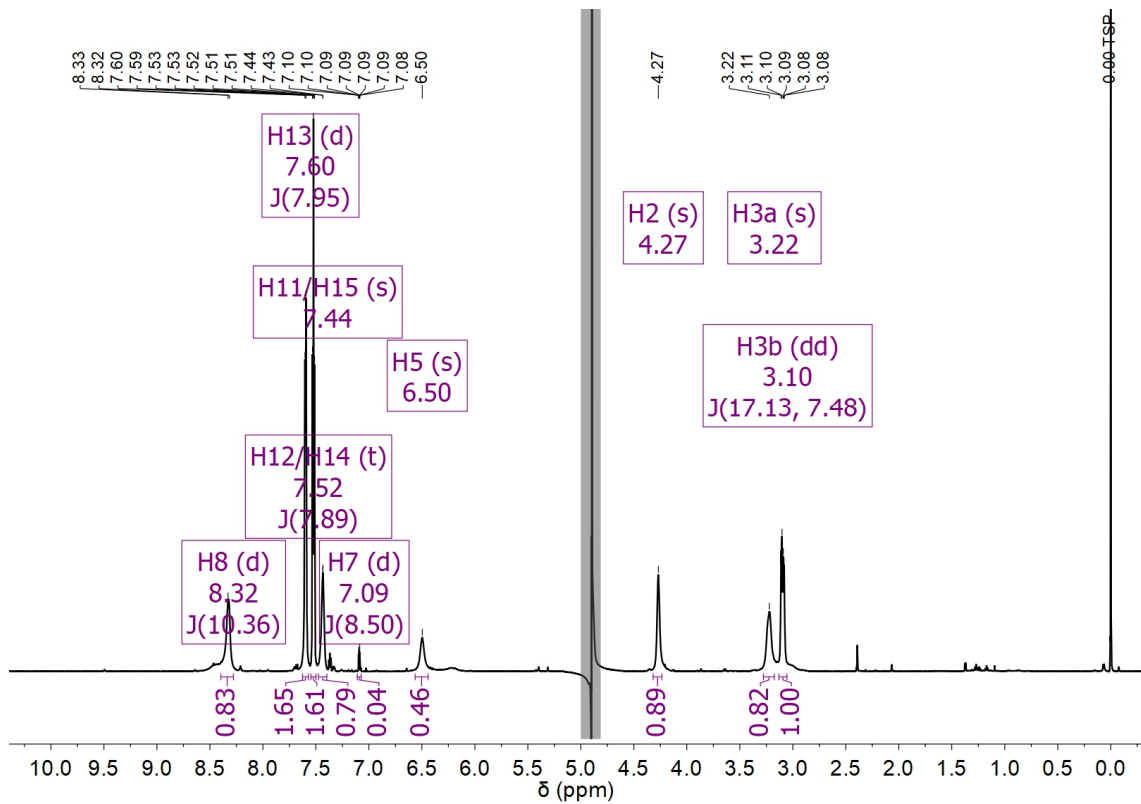
VI OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

VII. Estágios de pesquisa realizados durante o doutorado

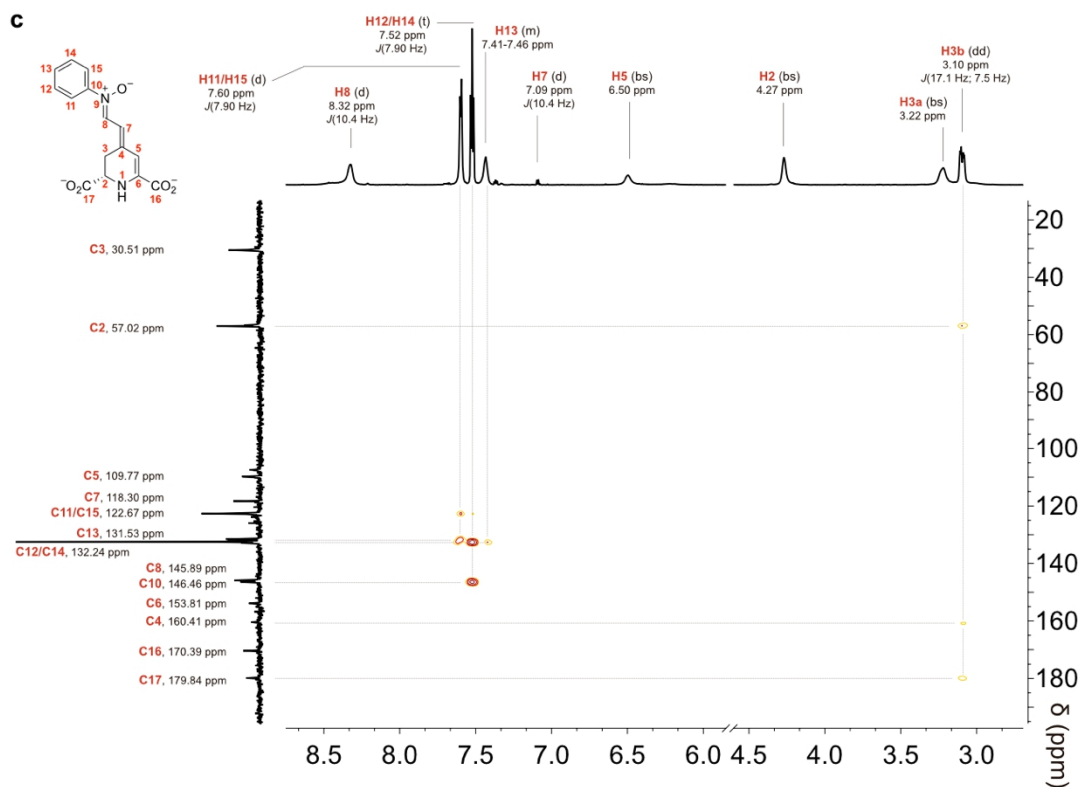
Novembro/2019 a Outubro/2020: *Ångström Laboratoriet*, Universidade de Uppsala sob orientação do Prof. Dr. Jacinto Sá.

Página deixada em branco intencionalmente

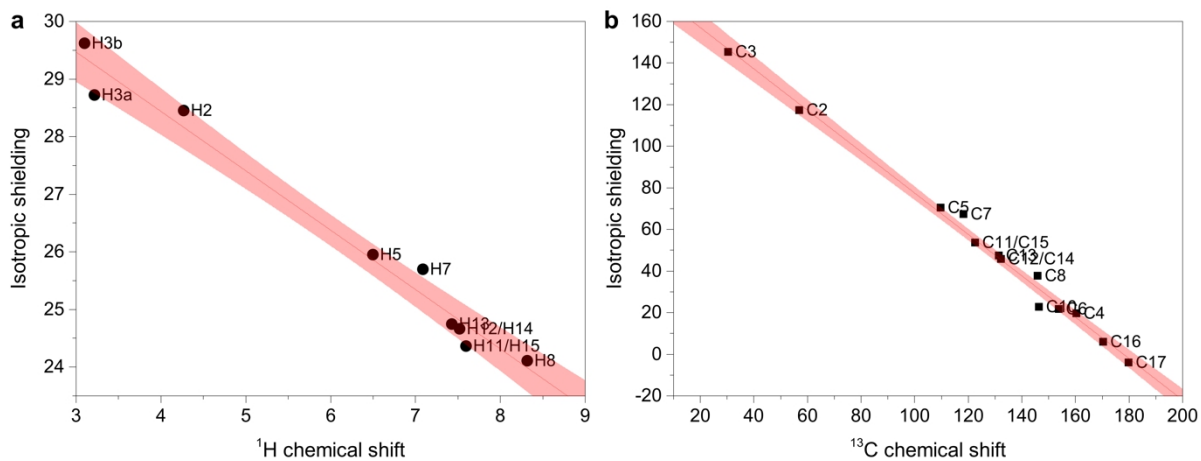
Anexos



Anexo 1. Espectro de ^1H (800 Hz) da OxiBeet em D_2O a $15\text{ }^\circ\text{C}$.

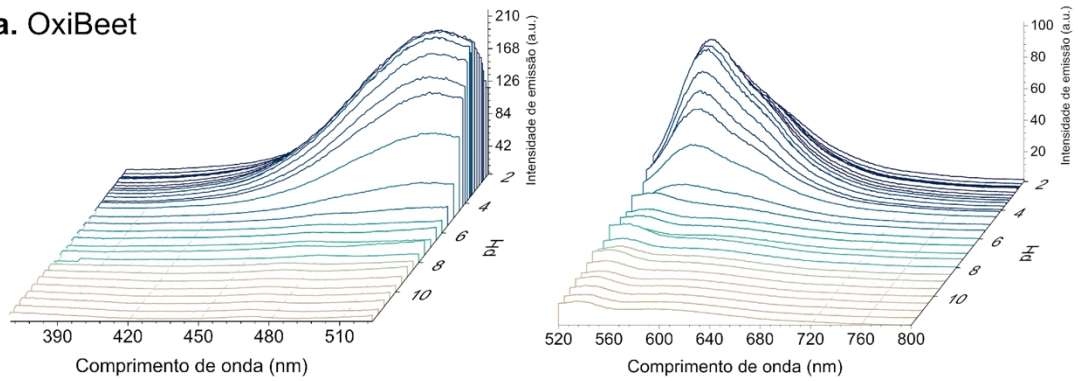


Anexo 2. Espectro de ^1H , ^{13}C -HMBC (800 Hz para ^1H e 200 Hz para ^{13}C) da OxiBeet em D_2O a $15\text{ }^\circ\text{C}$.

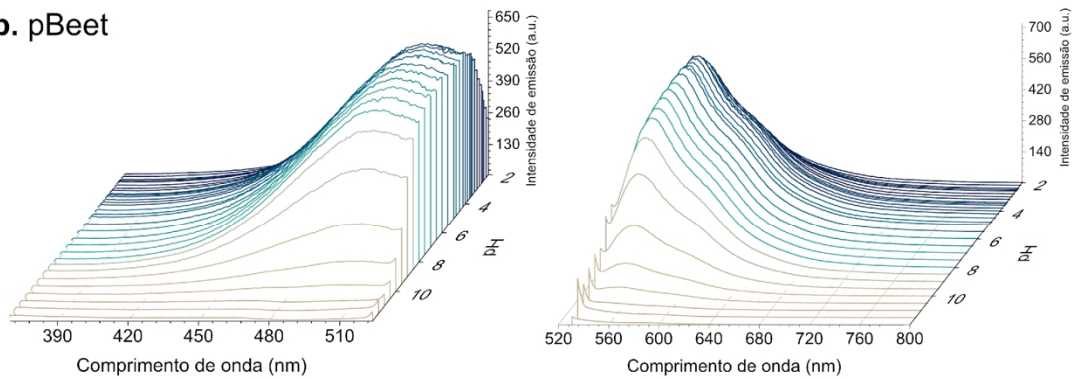


Anexo 3. Correlação entre os deslocamentos químicos experimentais de ^1H e ^{13}C obtidos para a OxiBeet e a blindagem isotrópica calculada pelo método GIAO no nível SMD/WP04/6-311+G(2d,p). (a) ^1H , $R^2 = 0,9770$; (b) ^{13}C , $R^2 = 0,9904$. A área sombreada é o intervalo de confiança de 95%.

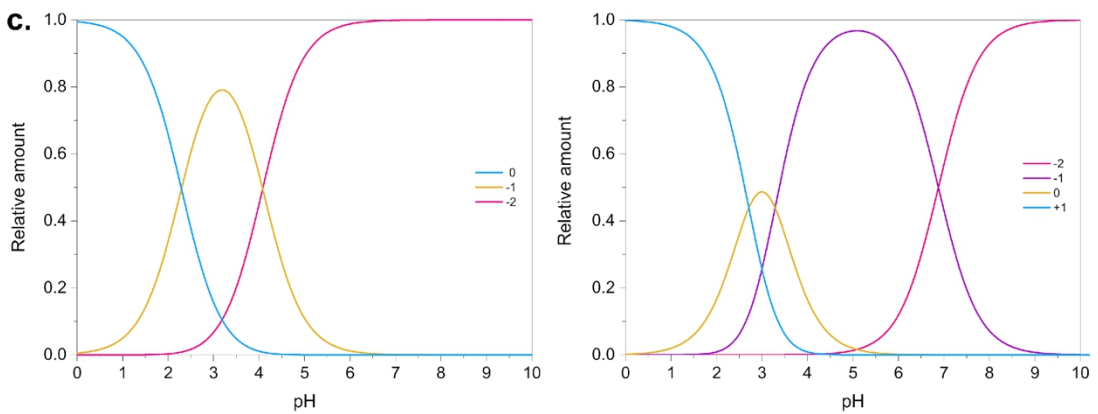
a. OxiBeet



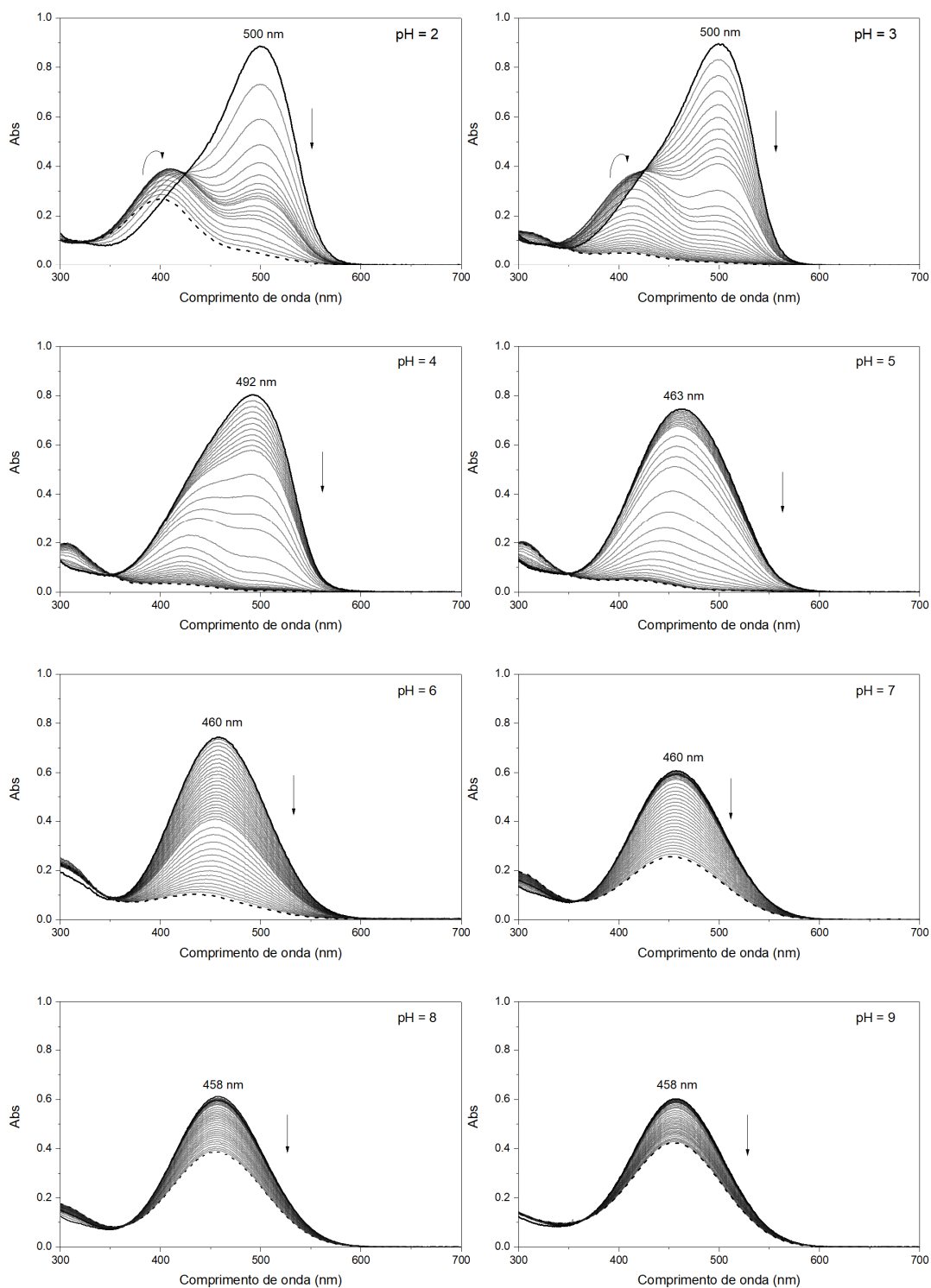
b. pBeet



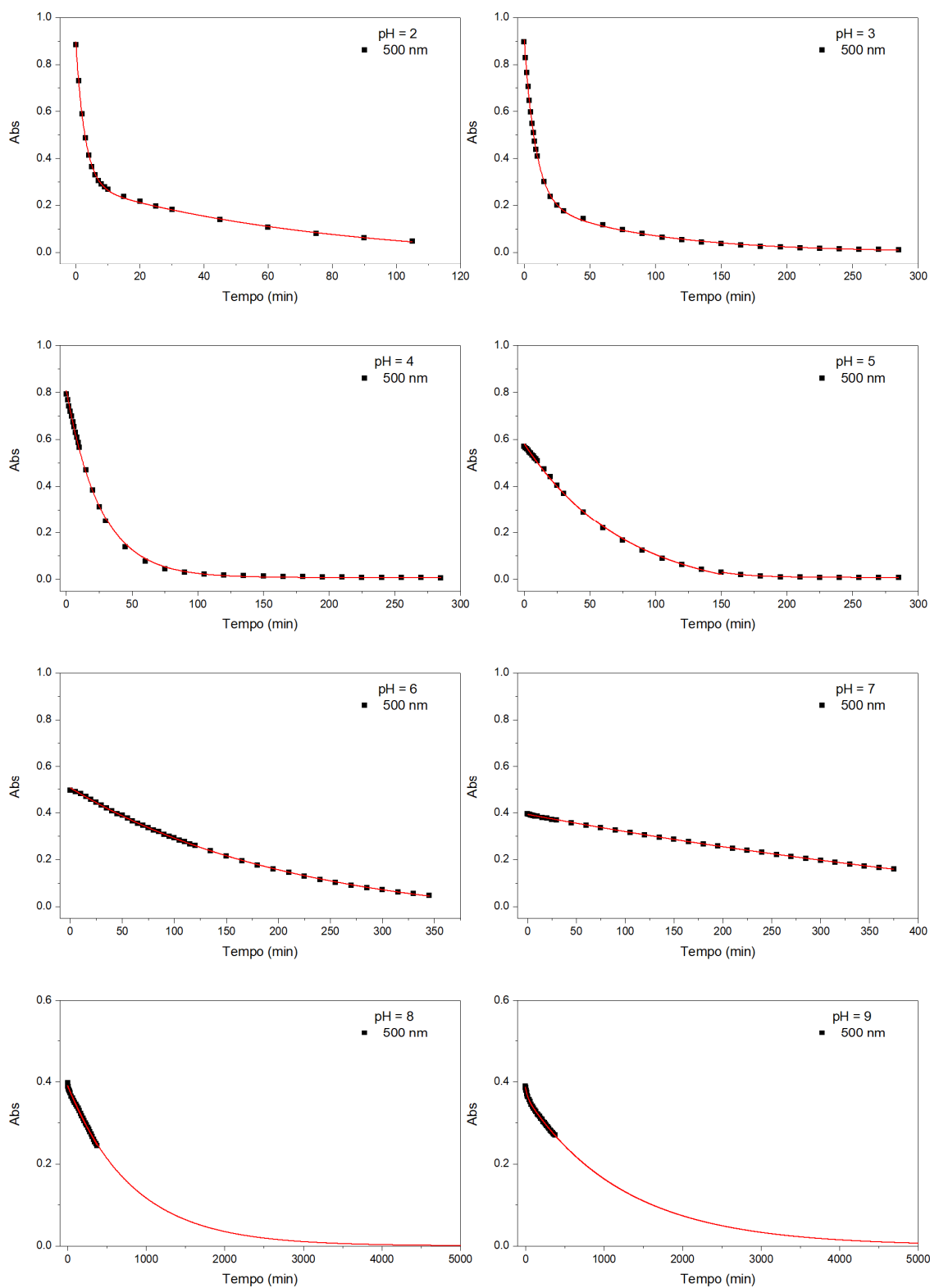
c.



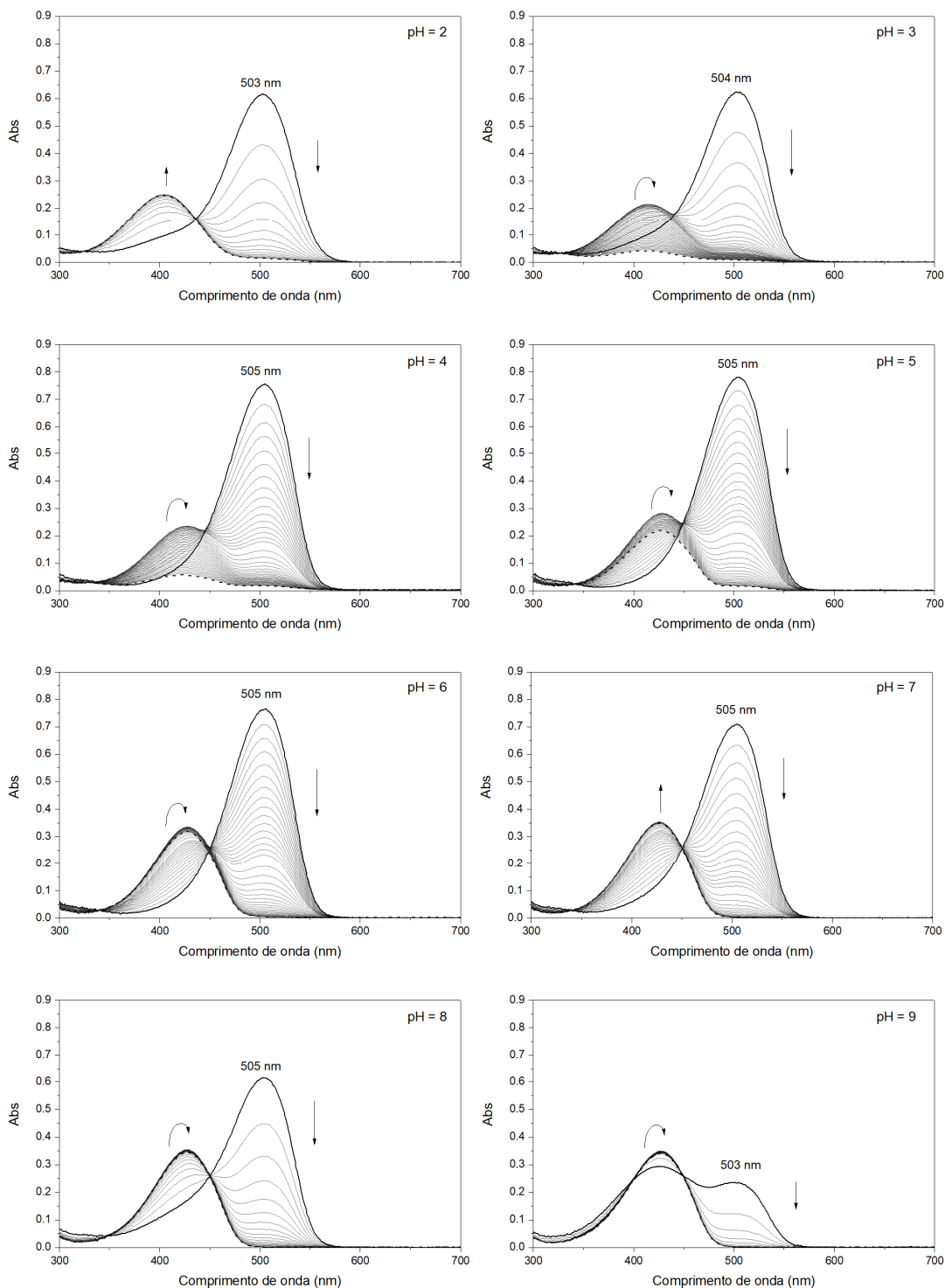
Anexo 4. Efeito do pH (tampão Britton-Robinson, pH 2 a 12) nos espectros de excitação e de emissão da (a) OxiBeet e da (b) pBeet. (c) Curvas de especiação da OxiBeet e da pBeet como uma função do pH calculada usando CurTiPot^[221]; as espécies são identificadas por suas cargas formais.



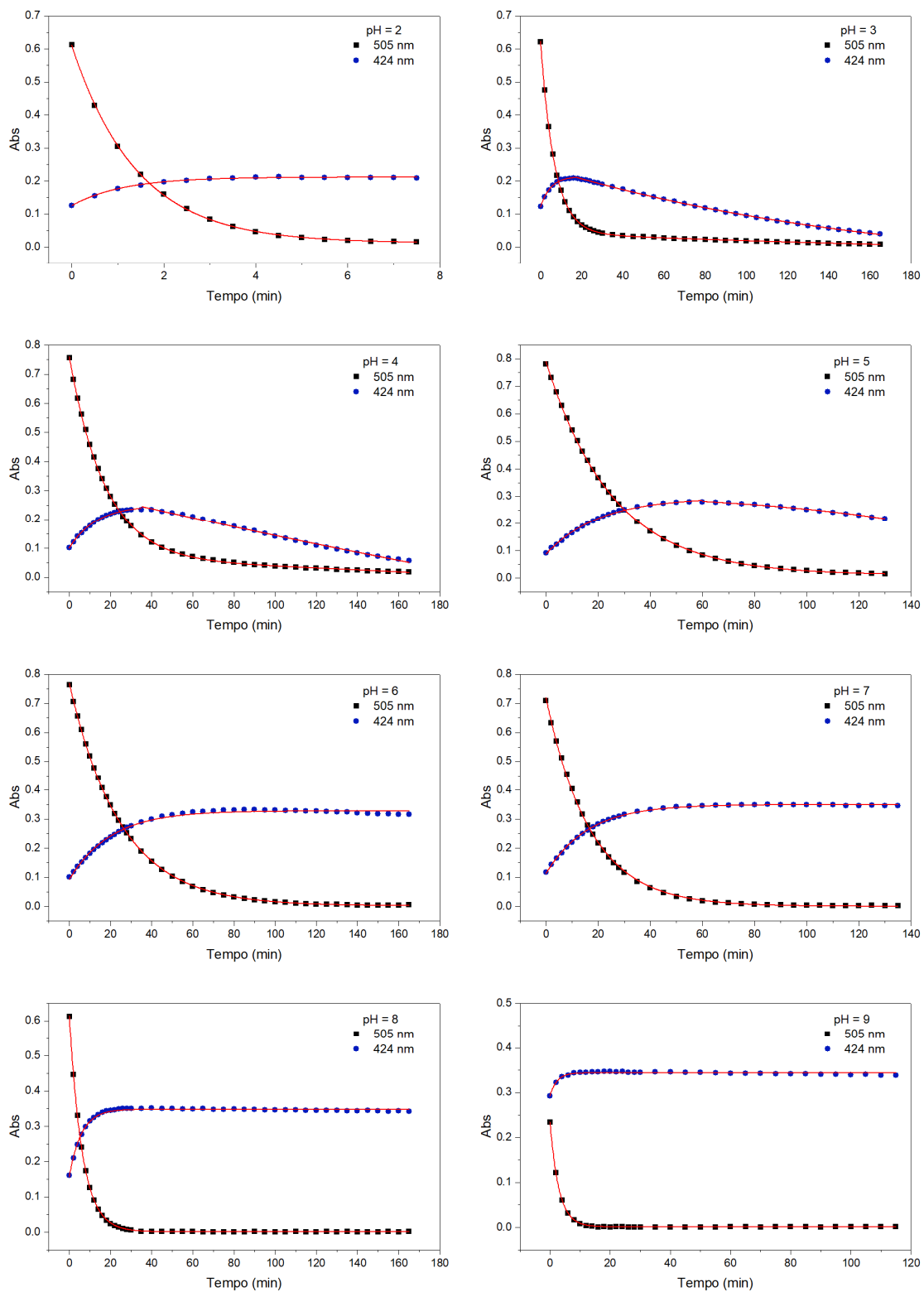
Anexo 5. Espectros de absorção da OxiBeet em tampão Britton-Robinson pH 2 a 9 a 60 °C com o decorrer do tempo. A decomposição da OxiBeet é evidenciada pelo desaparecimento da banda por volta de 500 nm em meio ácido e 458-460 nm em meio neutro/alcalino.



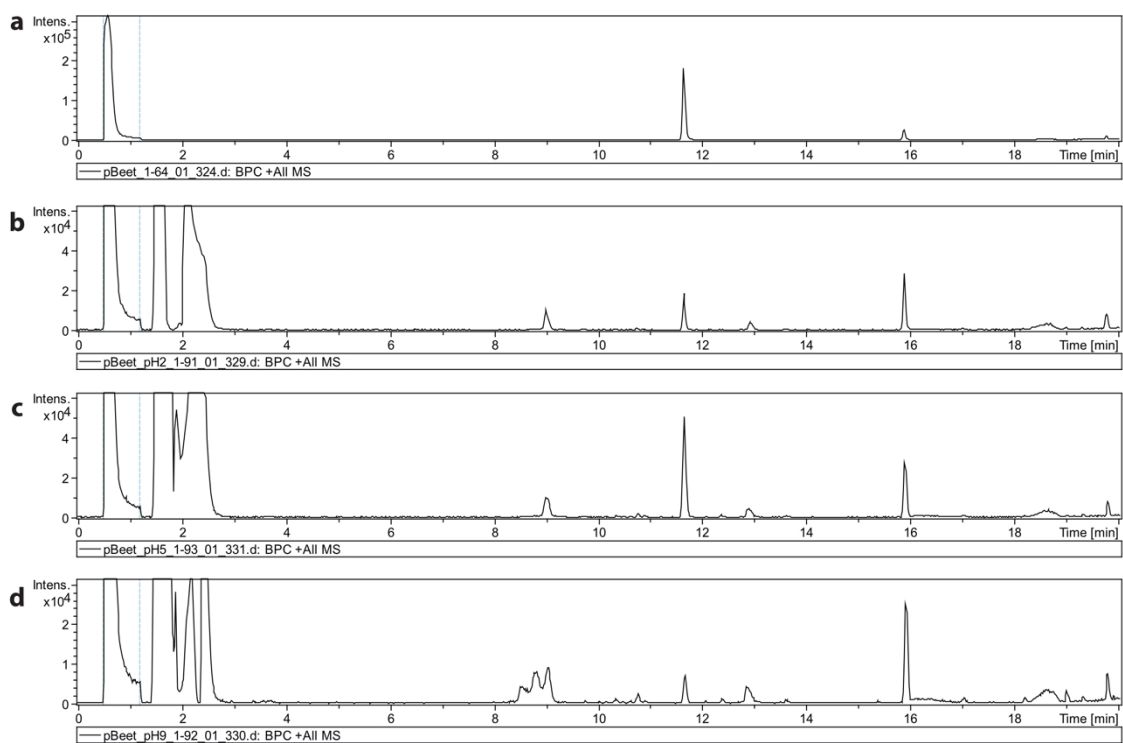
Anexo 6. Cinética de decomposição da OxiBeet em tampão Britton-Robinson pH 2 a 9 a 60 °C. A absorção foi monitorada em 500 nm. As linhas vermelhas são os ajustes das curvas exponenciais.



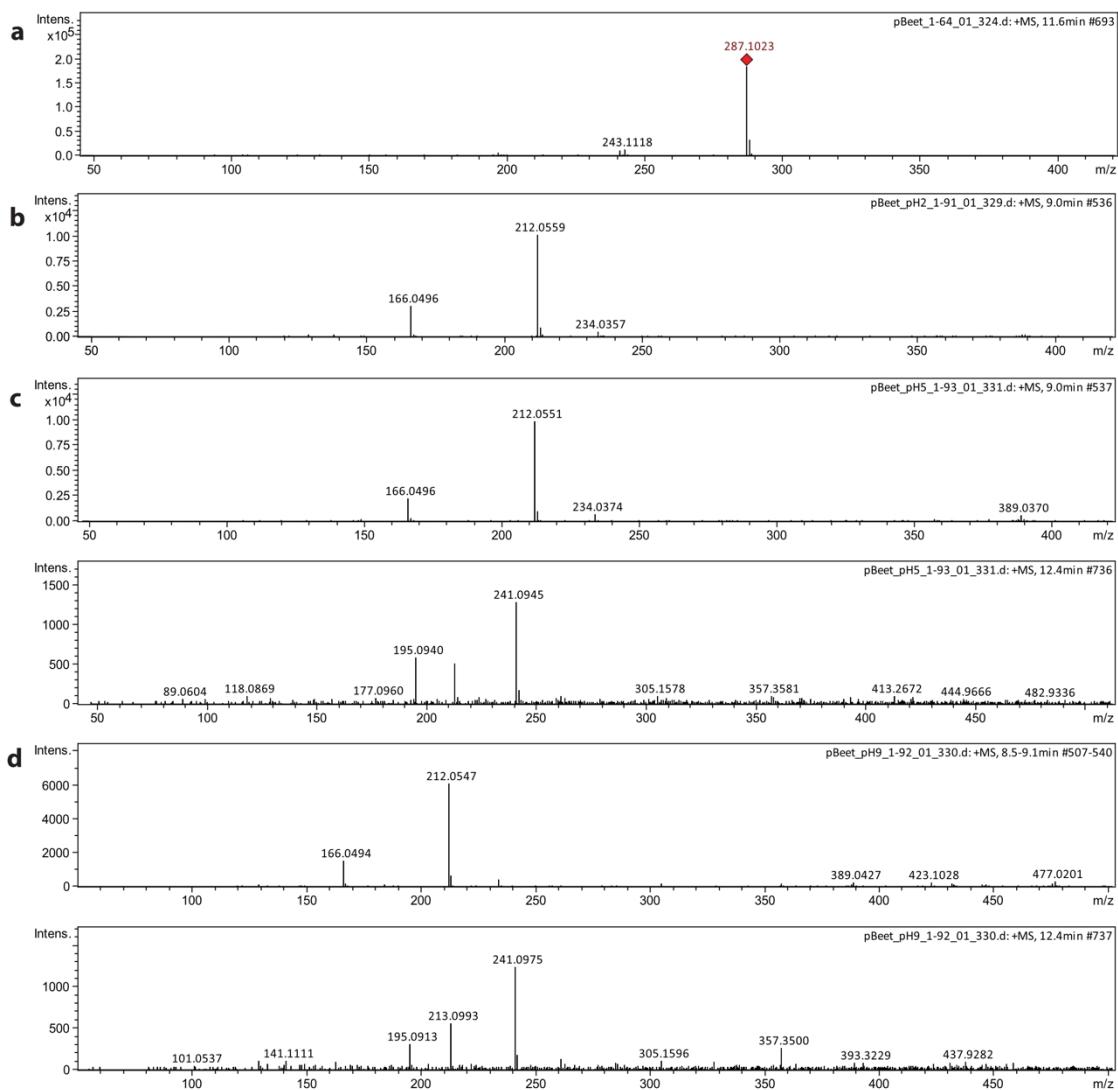
Anexo 7. Espectros de absorção da pBeet em solução tampão Britton-Robinson pH 2 a 9 a 60 °C com o decorrer do tempo. A decomposição da pBeet é evidenciada pelo desaparecimento da banda centrada em 505 nm.



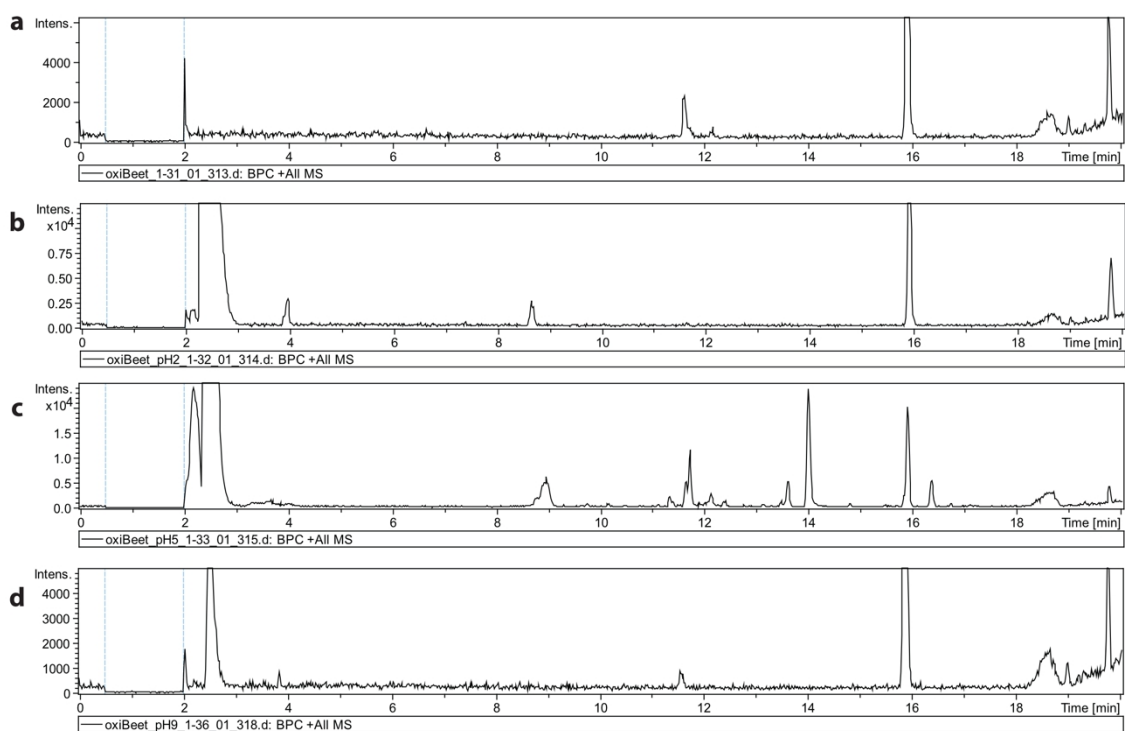
Anexo 8. Cinética de decomposição da pBeet em solução tampão Britton-Robinson pH 2 a 9 a 60 °C. A absorção foi monitorada no máximo de absorção da pBeet (505 nm) e do ácido betalâmico (424 nm). As linhas vermelhas são os ajustes das curvas exponenciais.



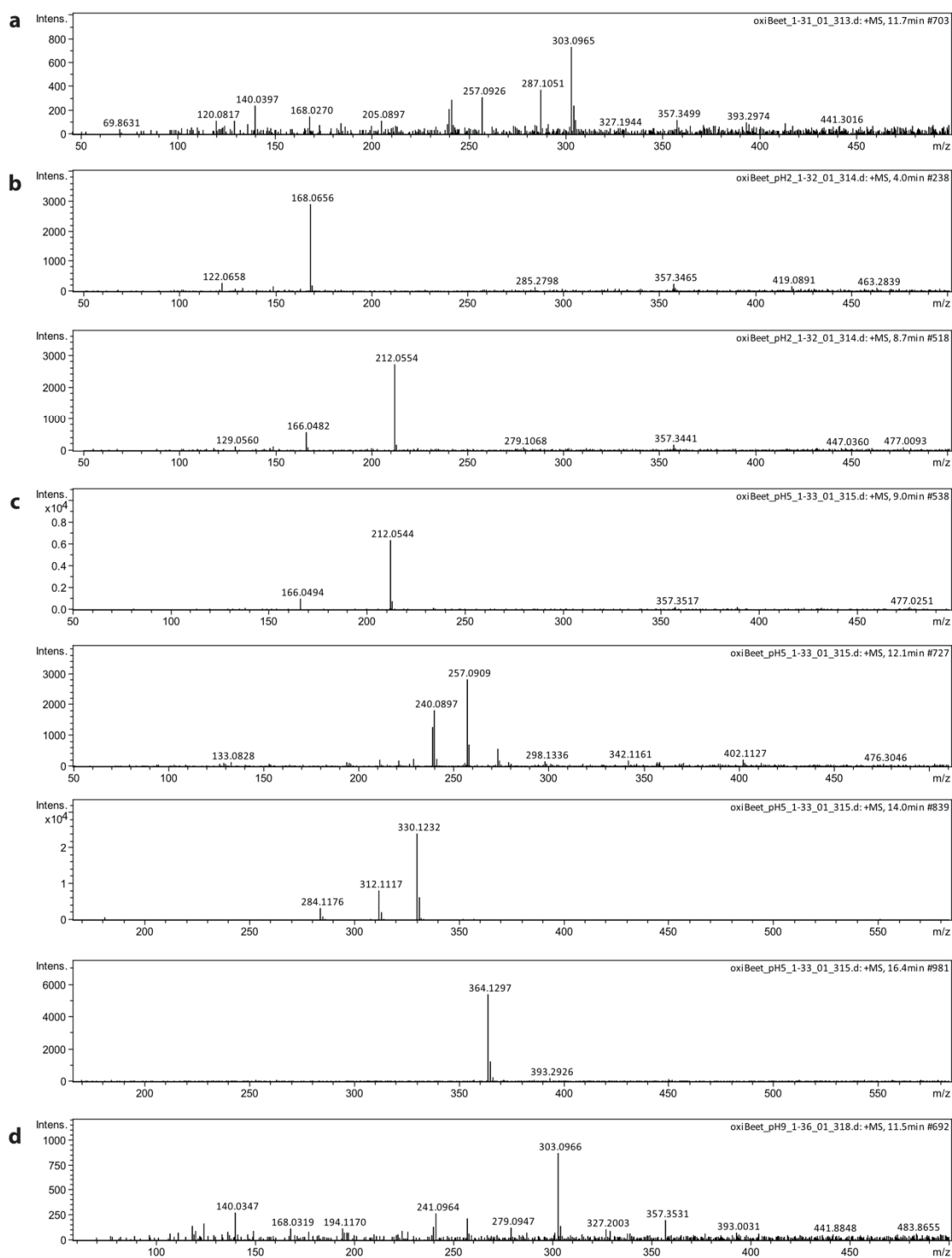
Anexo 9. Cromatograma do pico base de HPLC-ESI-q-TOF-MS da (a) pBeet em água; (b) pBeet em pH 2; (c) pBeet em pH 5 e (d) pBeet em pH 9 após o aquecimento ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$). O pico em 16 min é um contaminante da fase móvel.



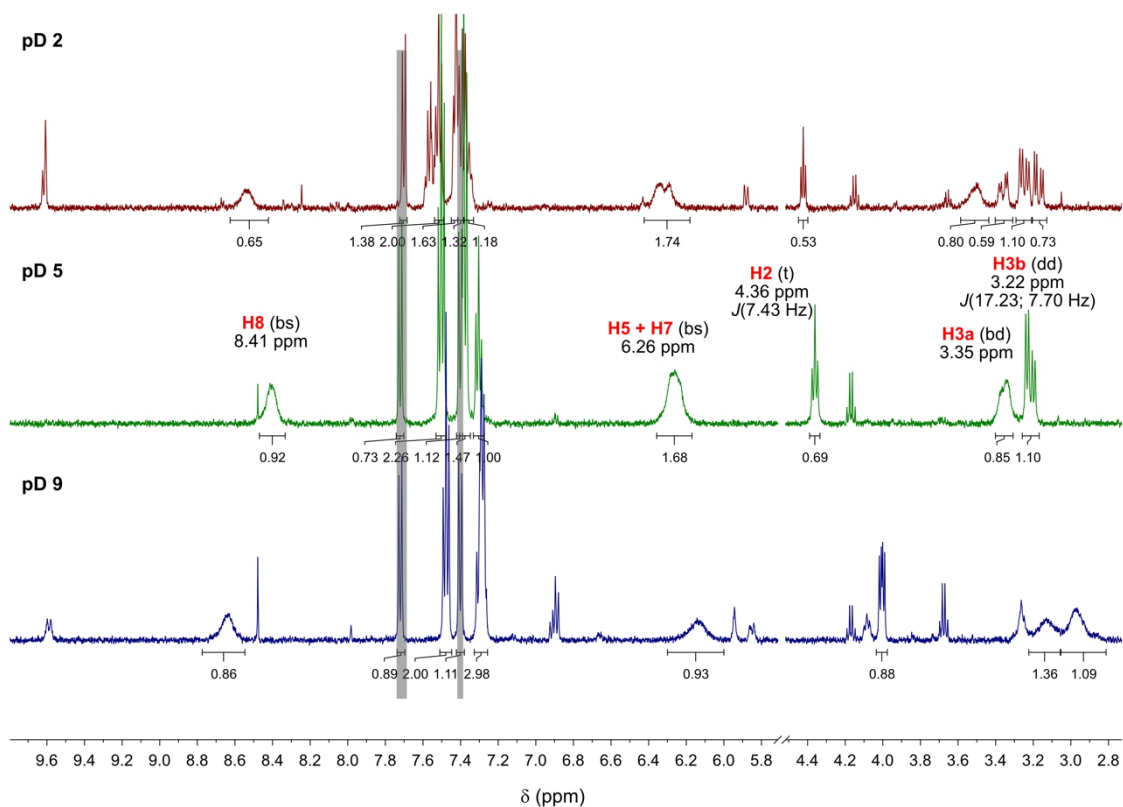
Anexo 10. Espectro de massas de ESI-qTOF-MS da pBeet em (a) água; (b) pH 2; (c) pH 5 e (d) pH 9 após o aquecimento ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$).



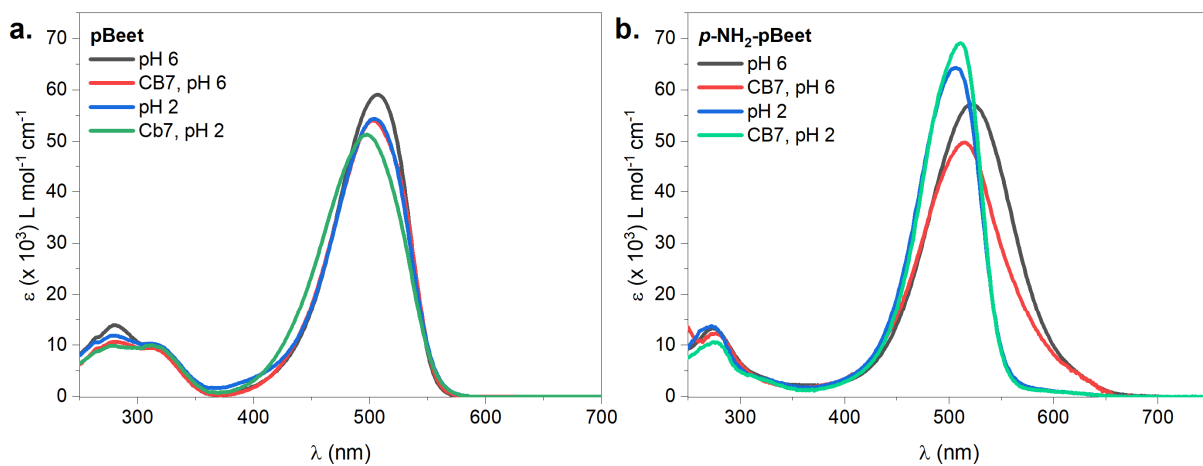
Anexo 11. Cromatograma do pico base do HPLC-ESI-qTOF-MS da (a) OxiBeet em água; (b) OxiBeet em pH 2; (c) OxiBeet em pH 5 e (d) OxiBeet em pH 9 após o aquecimento ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$).



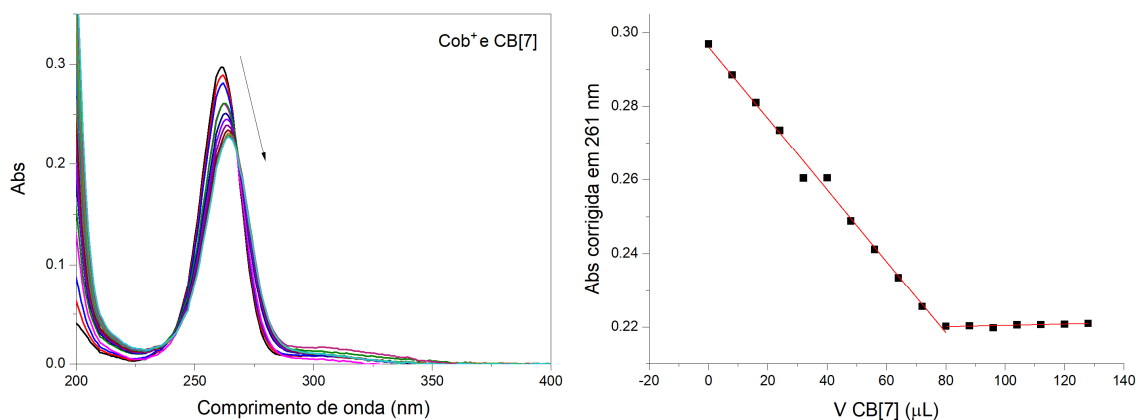
Anexo 12. Espectro de massas de ESI-qTOF-MS da OxiBeet em (a) água; (b) pH 2; (c) pH 5 e (d) pH 9 após o aquecimento ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$).



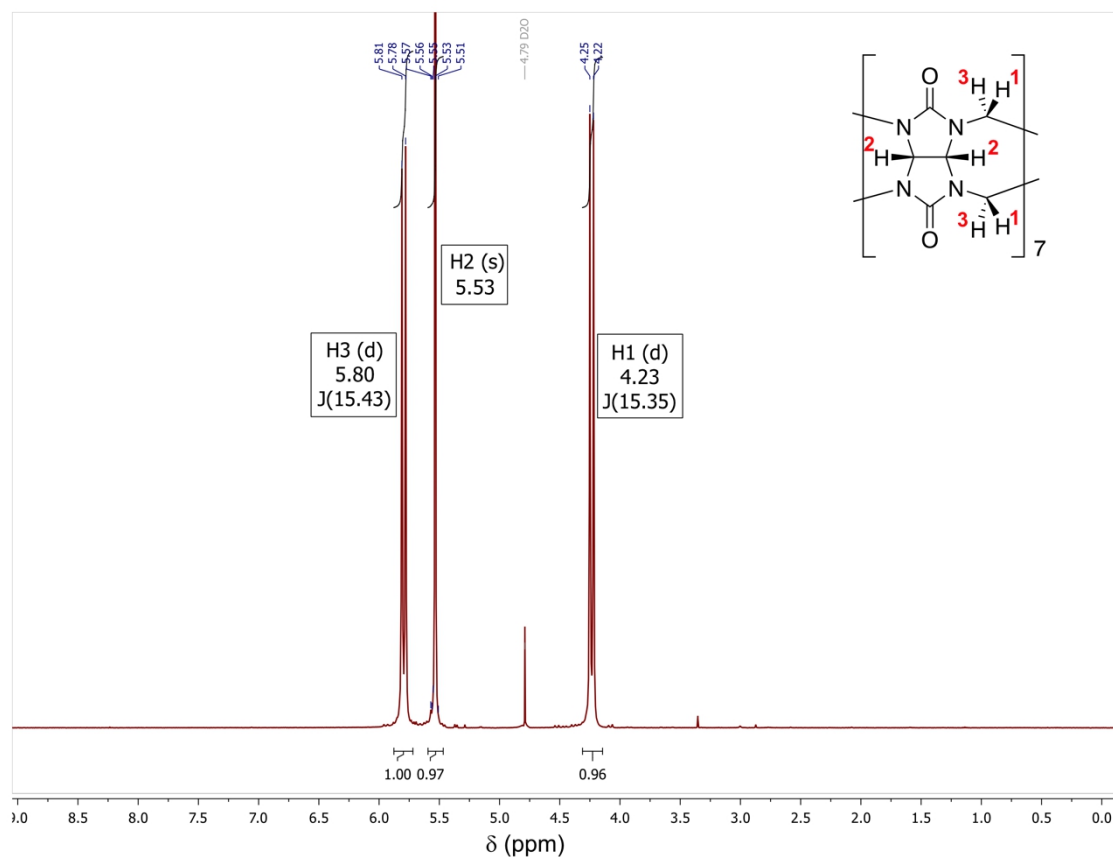
Anexo 13. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz) da pBeet em D_2O , pD 2, 5 e 9. Os pDs foram variados utilizando-se soluções de DCl ou NaOD.



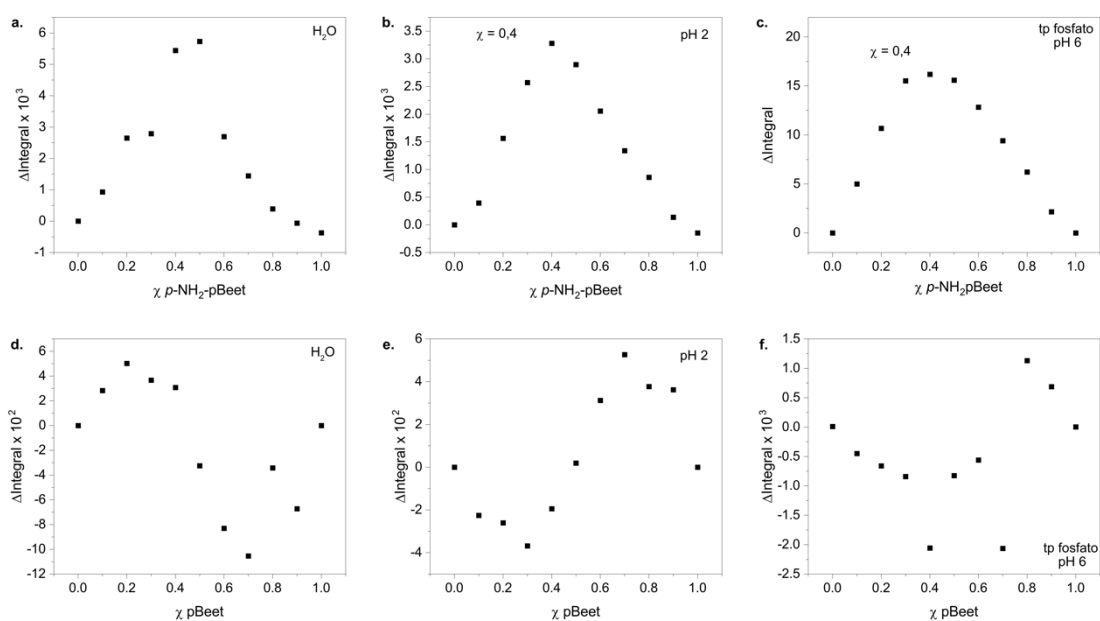
Anexo 14. (a) espectros de absorção da pBeet em água em pH 2 e 6, na presença e ausência de 5 equiv. de CB7 (b) espectros de absorção da p-NH₂-pBeet em água em pH 2 e 6, na presença e ausência de 5 equiv. de CB7.



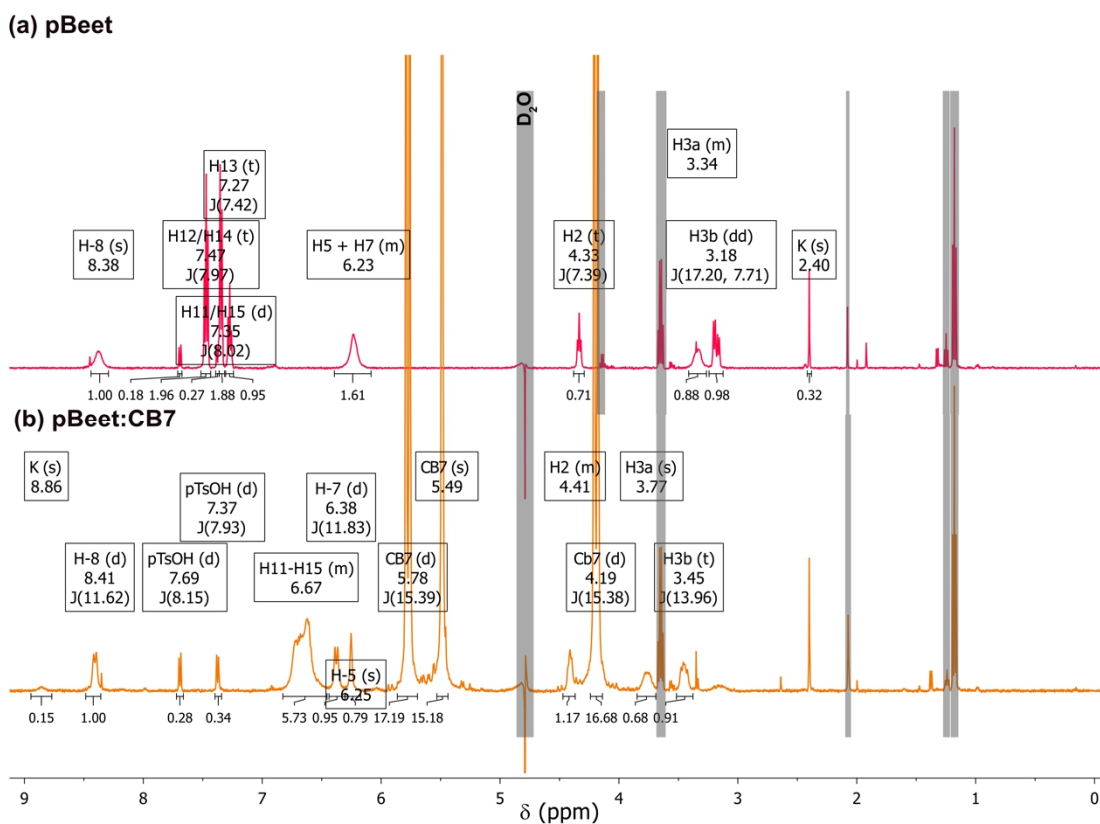
Anexo 15. (a) Espectros de absorção do cobaltoceno (Cob^+), após a adição de alíquotas de 8 μL de uma solução de cucurbit-[7]-urila (CB7) preparada em uma solução aquosa de HCL 1mmol L^{-1} ; (b) absorção corrigida pela diluição em 261 nm em função do volume de CB7 adicionado.



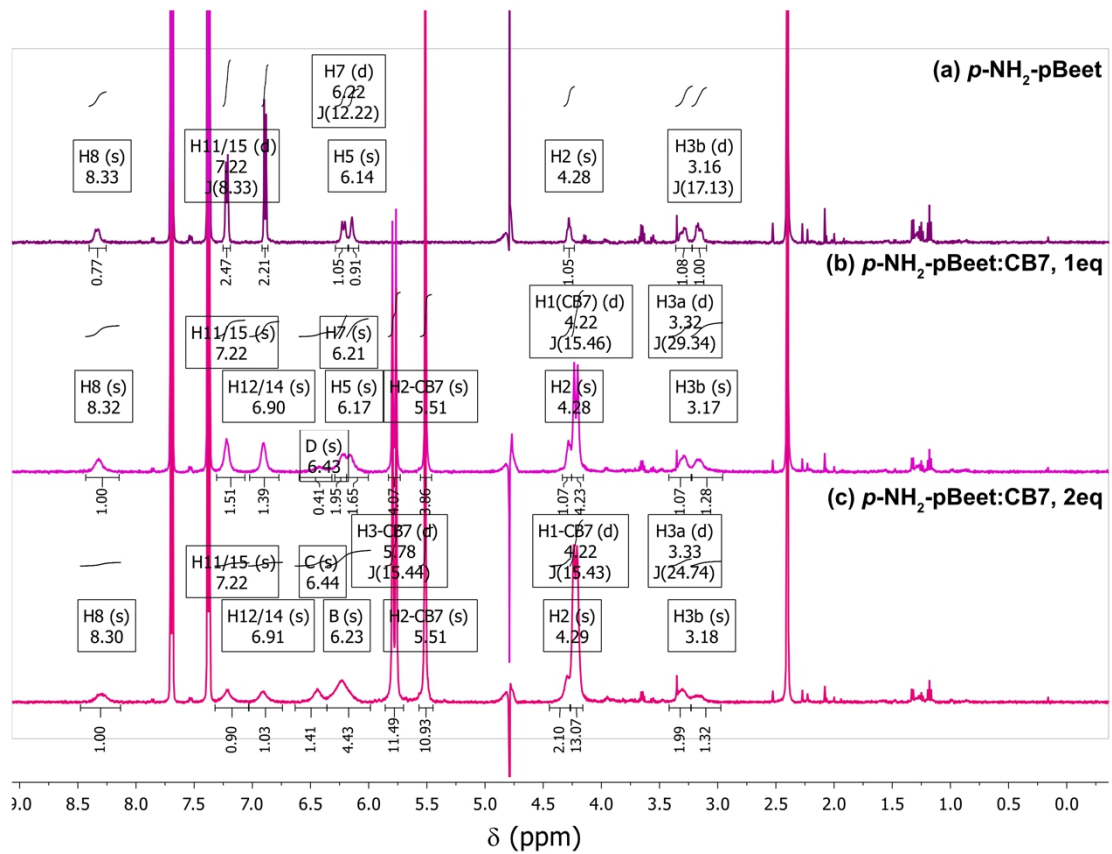
Anexo 16. Espectros de ^1H -RMN 500 MHz de cucurbit[7]urila em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$. O sinal da H_2O foi suprimido com a sequência de pulsos *zgpr*.



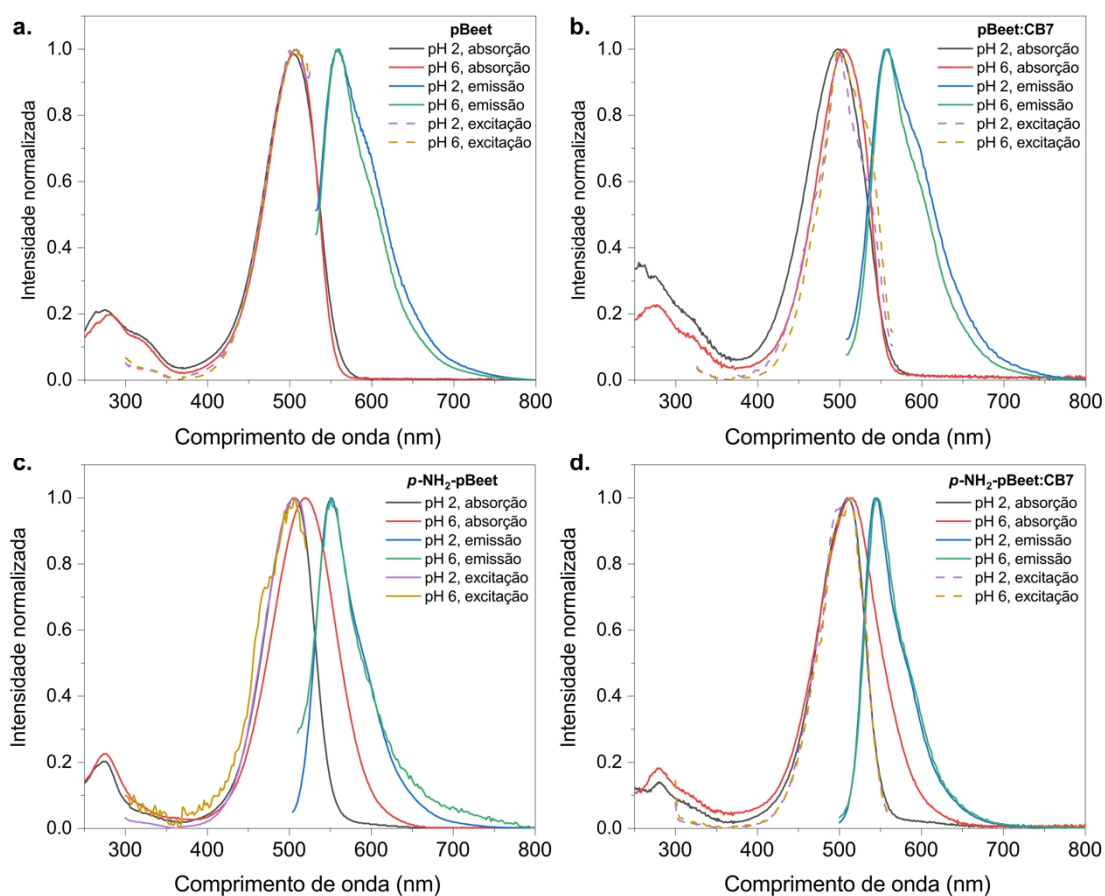
Anexo 17. Gráficos de Job de a, b, c $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$; d,e,f $p\text{Beet}$



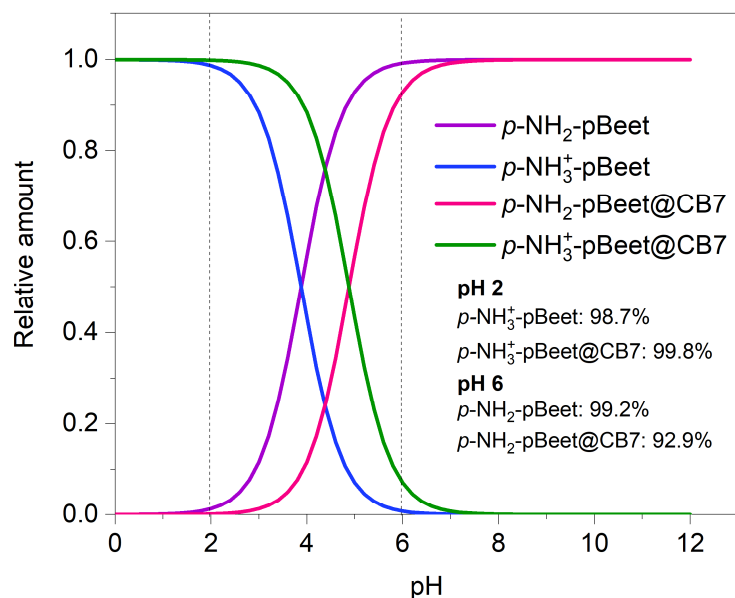
Anexo 18. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ 500 MHz de (a) $p\text{Beet}$ e (b) $p\text{Beet}$ na presença de 1 equiv. de cucurbit[7]-urila em D_2O a 25°C . O sinal da H_2O foi suprimido com a sequência de pulsos *zgpr*.



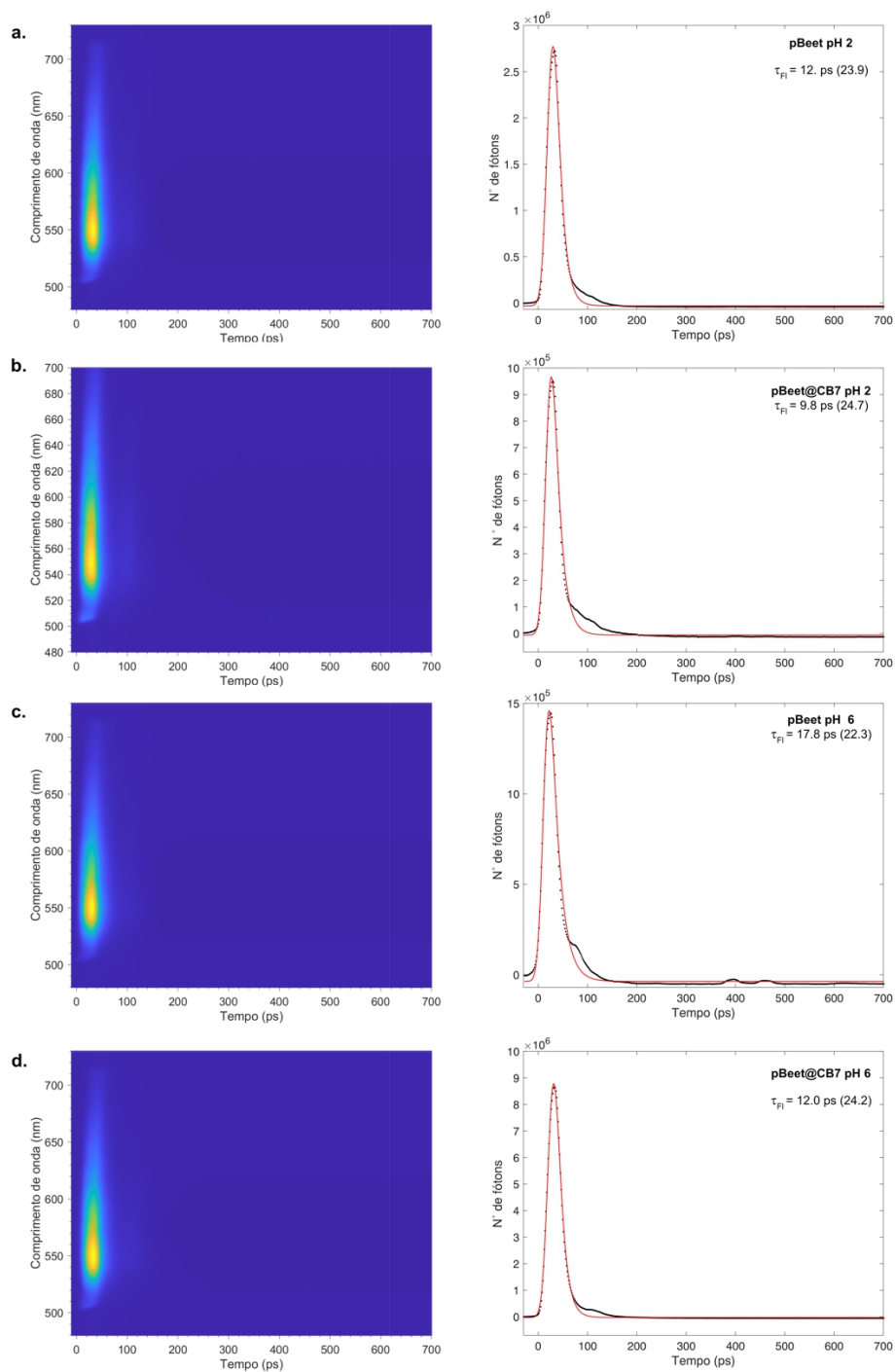
Anexo 19. Espectros de ^1H -RMN 500 MHz de (a) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$; (b) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ e 1 equiv. de cucurbit-[7]-urila; (c) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ e 2 equiv. de CB7 em D_2O a 25 °C.



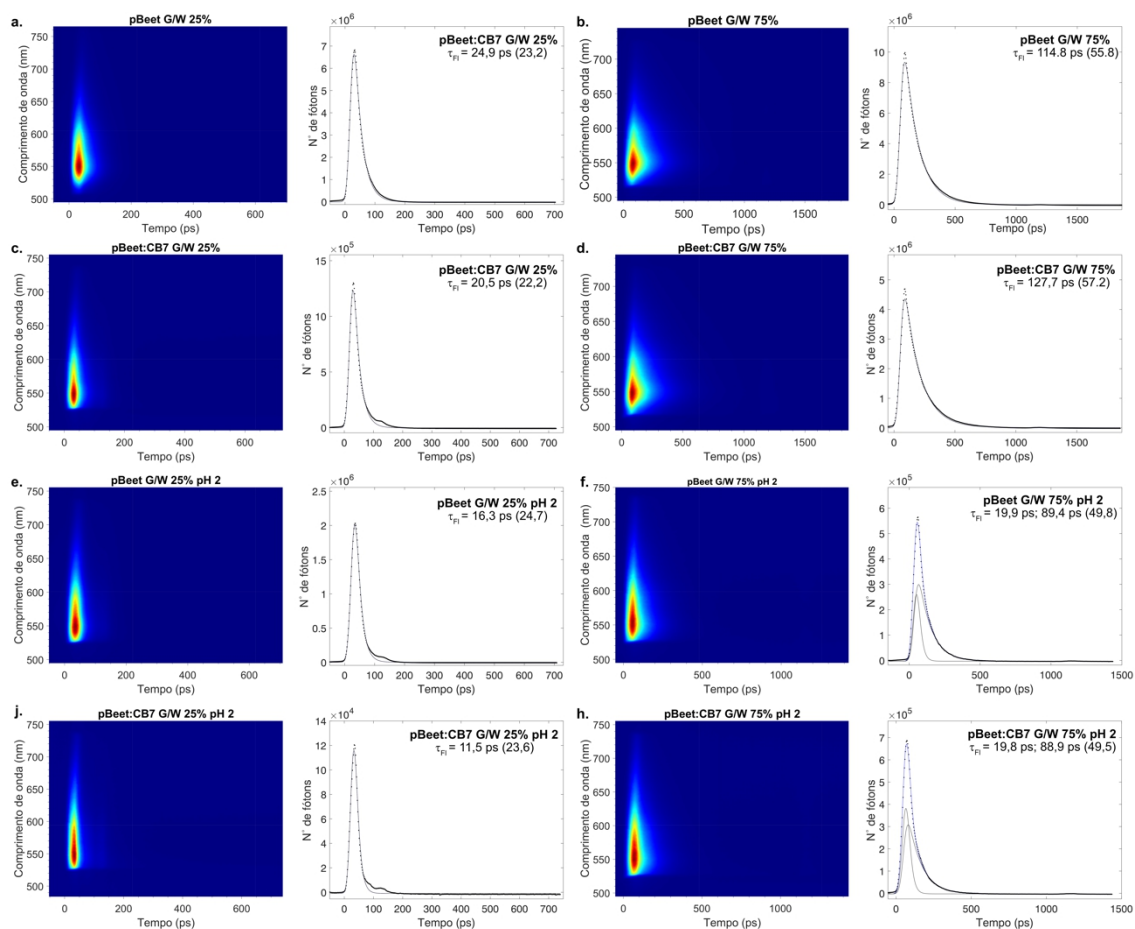
Anexo 20. Espectros de absorção, emissão e excitação em tampão nos pHs 2 e 6 da (a) pBeet; (b) pBeet:CB7; (c) *p*-NH₂-pBeet; (d) *p*-NH₂-pBeet:CB7.



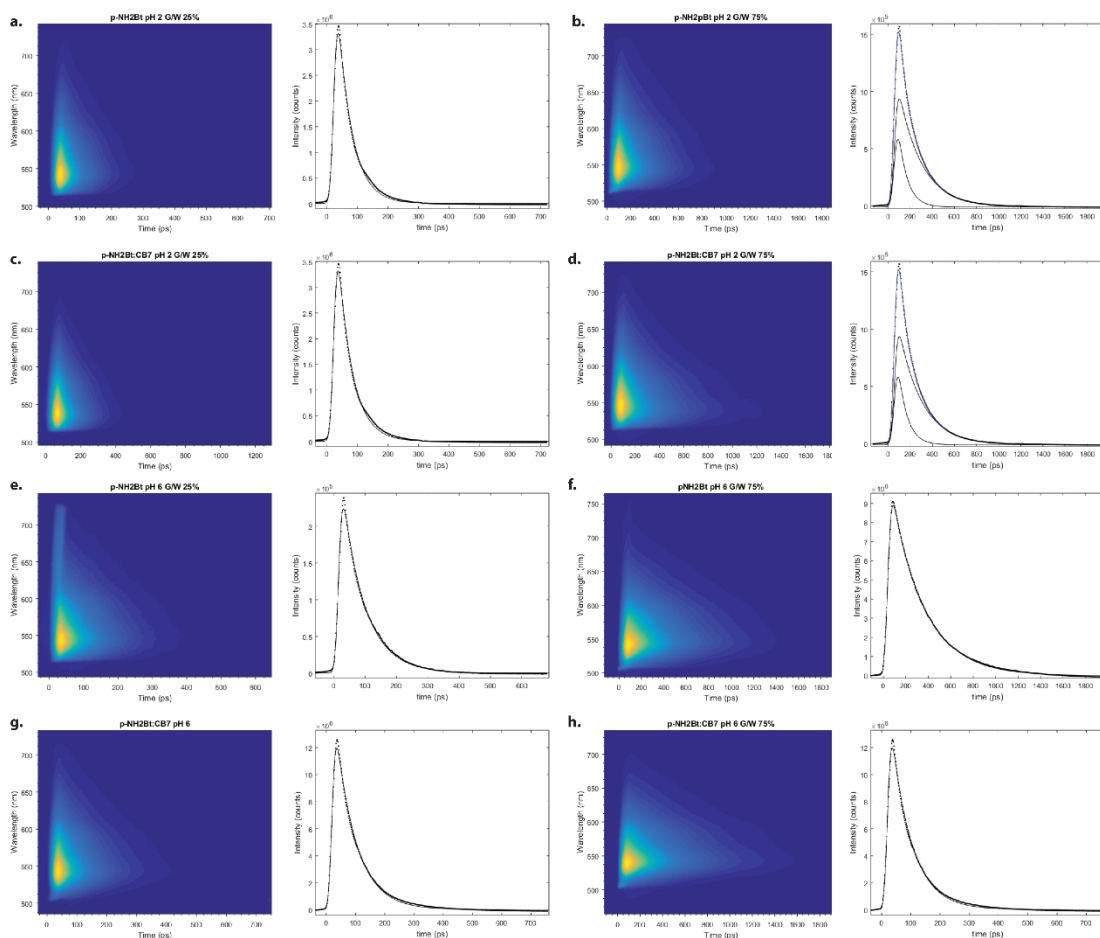
Anexo 21. Curvas de especiação da *p*-NH₂-pBeet e do complexo *p*-NH₂-pBeet@CB7 como uma função do pH calculada usando CurTiPot^[221].



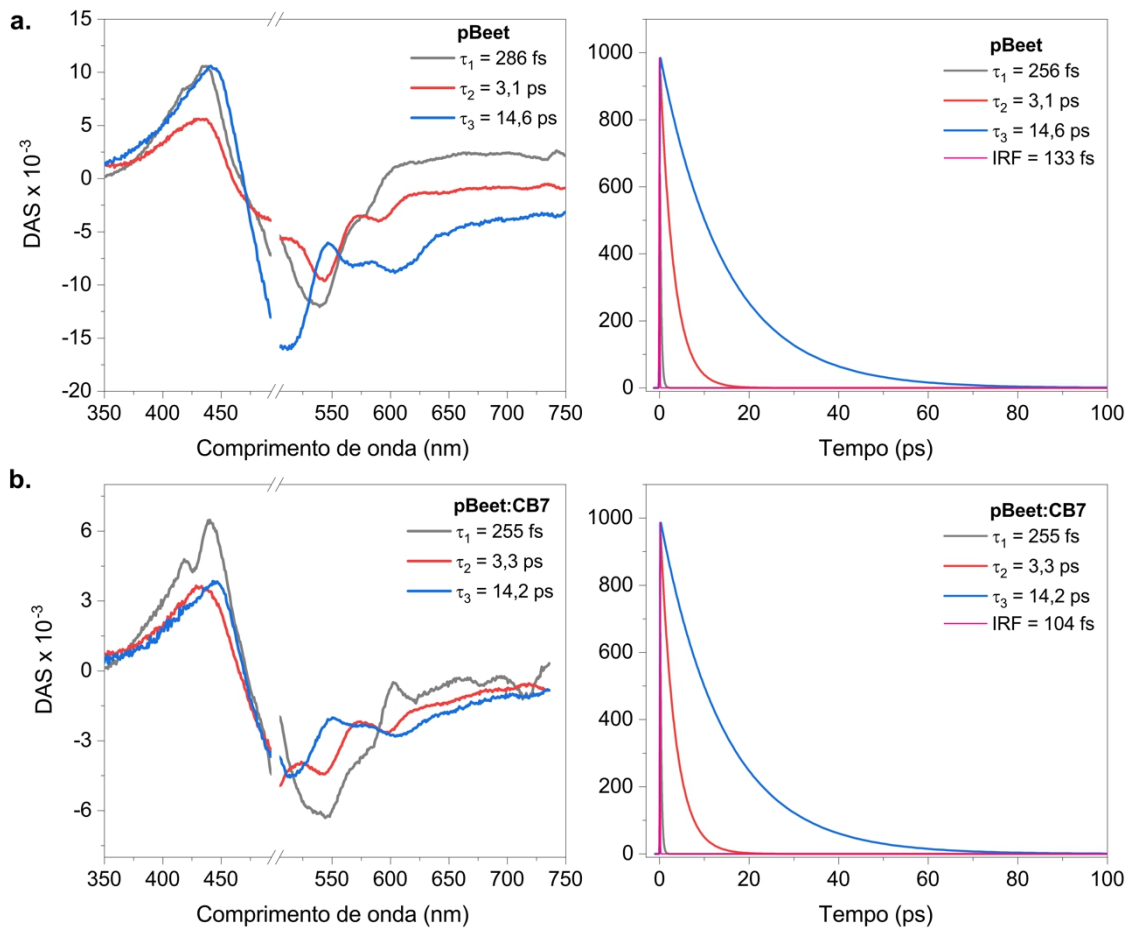
Anexo 22. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência da pBeet detectada por um sistema *streak* câmera em água (a) pH 2; (b) pH 6; (c) pH2 na presença de CB7; (d) pH 6 na presença de CB7. $\lambda_{exc} = 500$ nm. O valor entre parênteses é referente ao IRF (*instrument response function*).



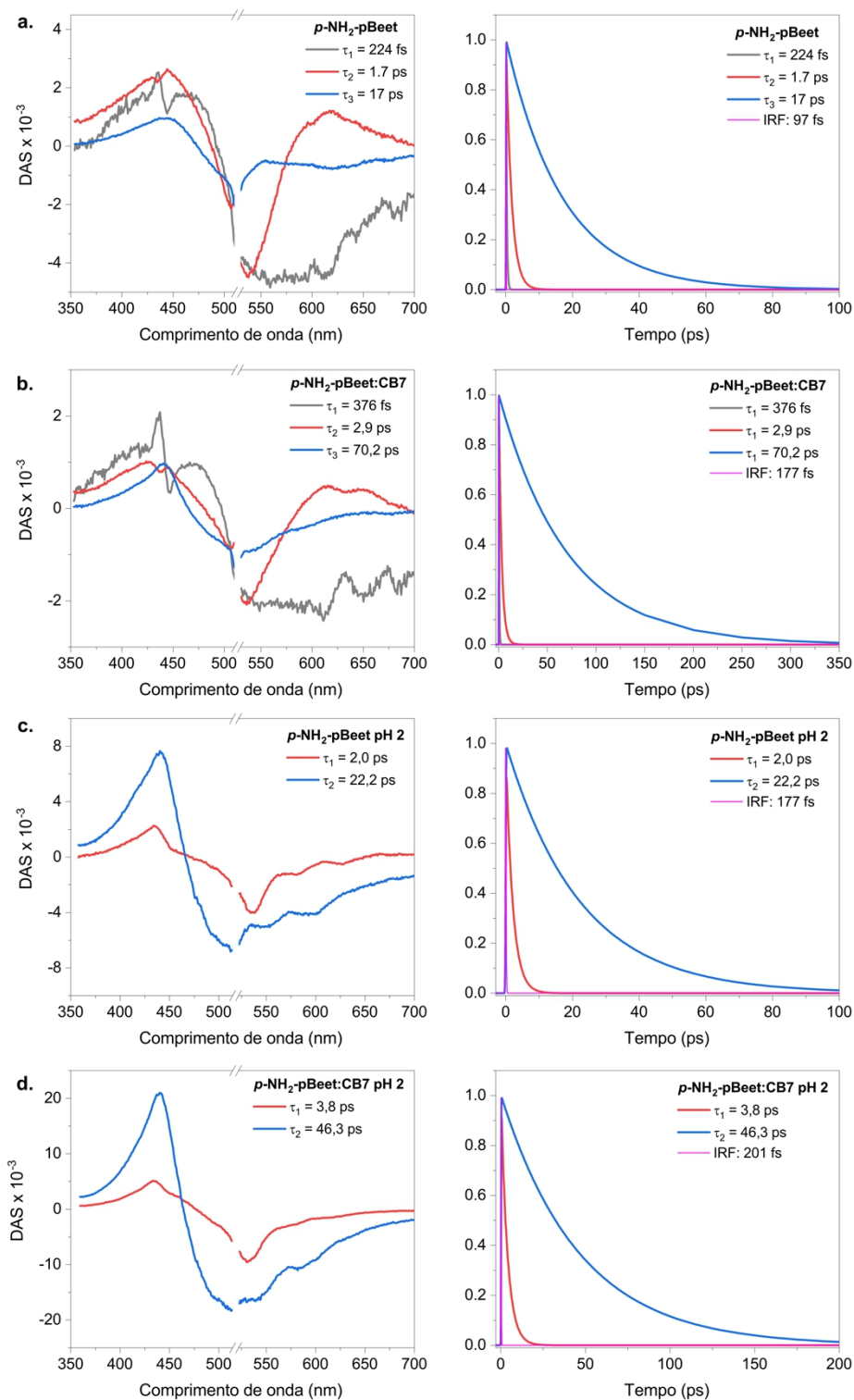
Anexo 23. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência da pBeet medida em um sistema de detecção *streak câmera* em (a) 25% G/W, pH 6; (b) 75% G/W, pH 6; (c) 25% G/W, pH 6 na presença de CB7; (d) 75% G/W, pH 6 na presença de CB7; (e) 25% G/W, pH 2; (f) 75% G/W, pH 2; (g) 25% G/W, pH 2 na presença de CB7; (h) 75% G/W, pH 2 na presença de CB7; (i). $\lambda_{exc} = 500$ nm.



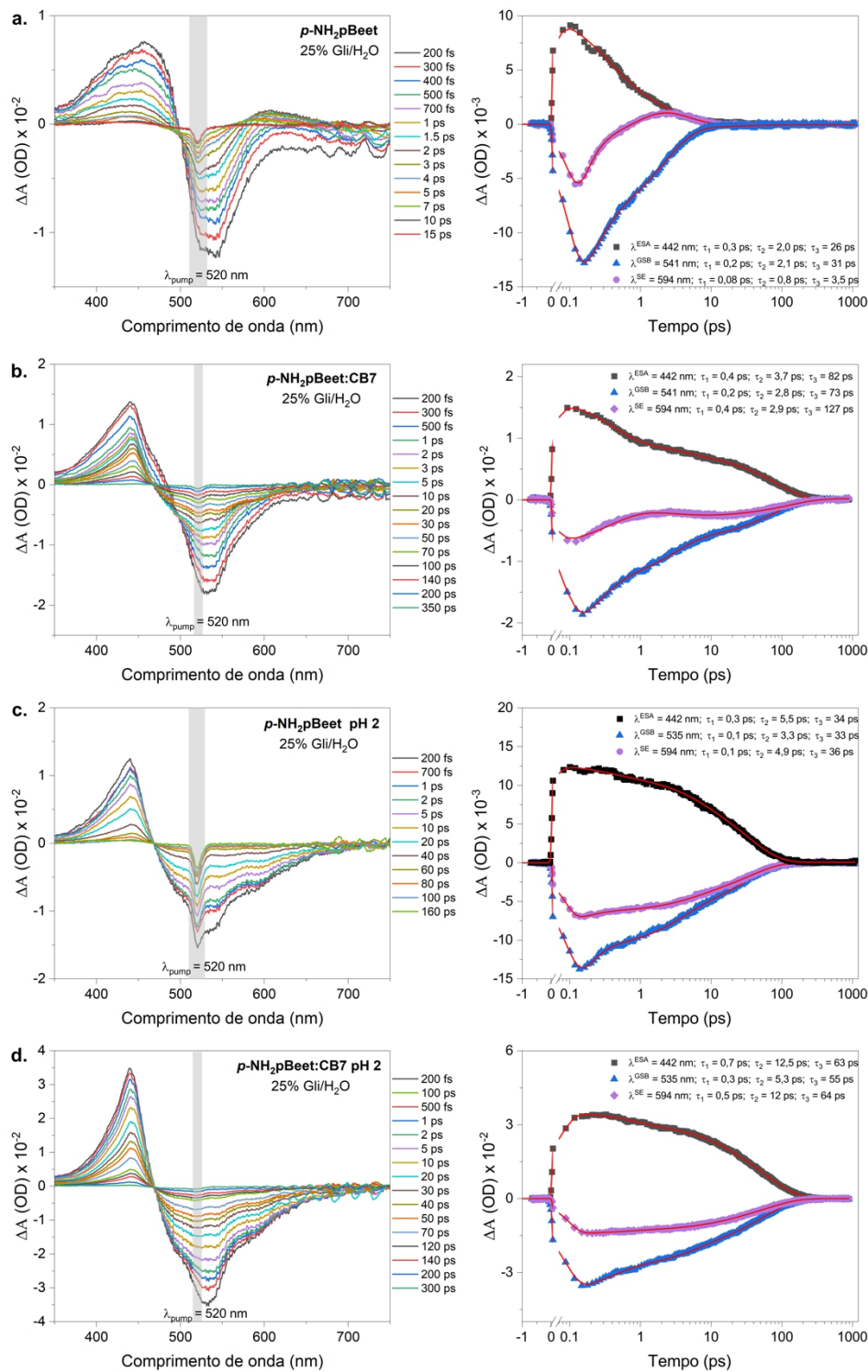
Anexo 24. Decaimentos do tempo de vida de fluorescência da p-NH₂-pBeet medida com um sistema de detecção streak câmara em (a) 25% G/W, pH 2; (b) 75% G/W, pH 2; (c) 25% G/W, pH 2 na presença de CB7; (d) 75% G/W, pH 2 na presença de CB7; (e) 25% G/W, pH 6; (f) 75% G/W, pH 6; (g) 25% G/W, pH 6 na presença de CB7; (h) 75% G/W, pH 6 na presença de CB7. $\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}$.



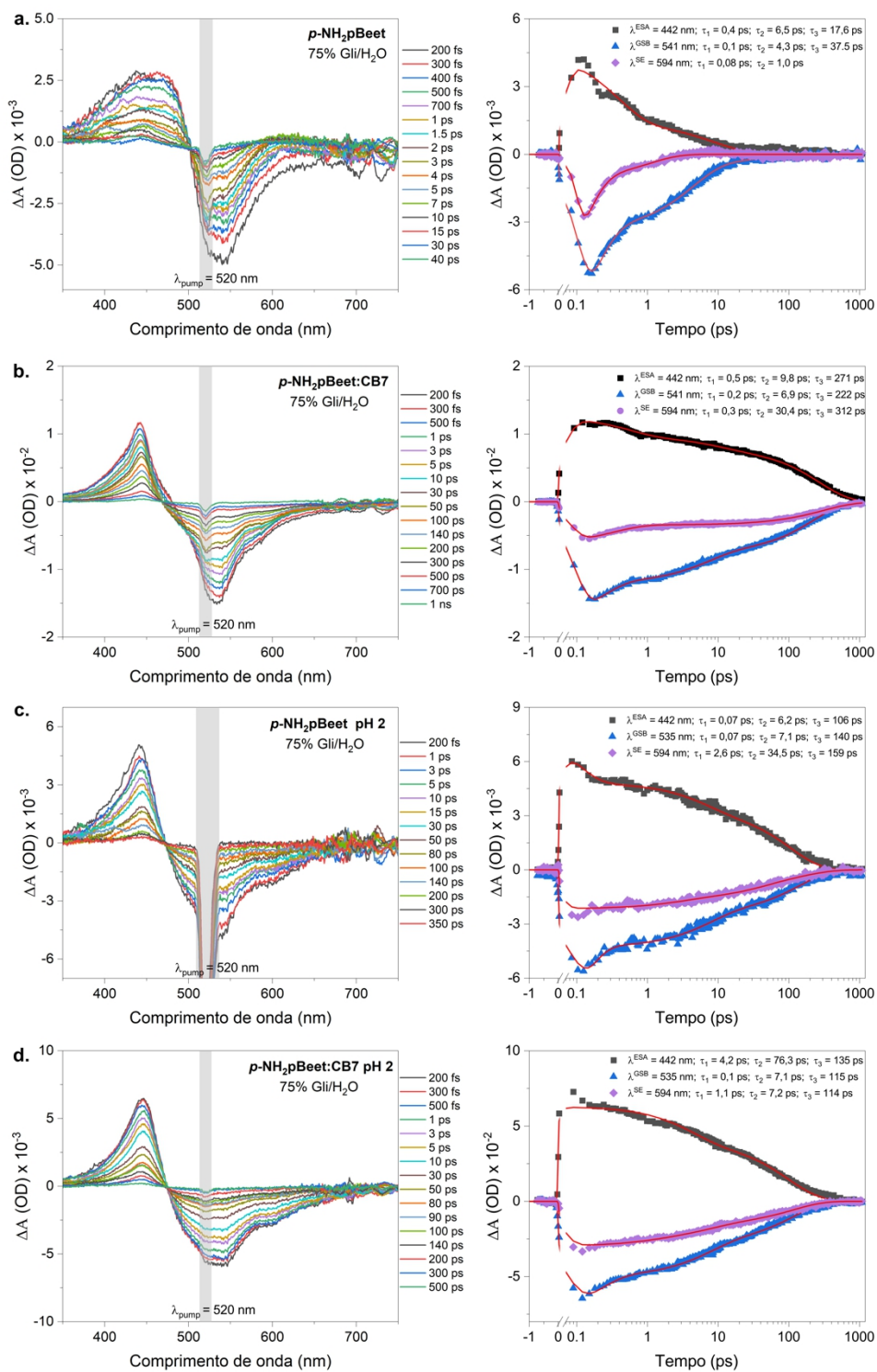
Anexo 25. Espectros de decaimento associado (DAS) e os respectivos decaimentos temporais ajustados com 3 exponenciais com o software Glotaran utilizando um modelo paralelo. (a) pBeet; (b) complexo de inclusão pBeet:CB7 (1:5 equiv.)



Anexo 26. Espectros de decaimento associado (DAS) e os respectivos decaimentos temporais normalizados ajustados com 3 exponenciais com o software Glotaran. (a) $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$; (b) complexo de inclusão $p\text{-NH}_2\text{-pBeet:CB7}$ (1:5 equiv.)



Anexo 27. Espectro de absorção transiente em escala de femtosegundos da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em misturas de 25% glicerol/água (m/m) em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (5 equiv), $\lambda_{\text{pump}} = 520 \text{ nm}$.



Anexo 28. Espectro de absorção transiente em escala de femtosegundos da $p\text{-NH}_2\text{-pBeet}$ em misturas de 75% glicerol/água (m/m) em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (5 equiv), $\lambda_{\text{pump}} = 520 \text{ nm}$.

Anexo 29. Tempos de vida do estado excitado determinados por absorção transiente da *p*-NH₂-pBeet em diferentes condições: água e misturas de glicerol/água (m/m), em pH 2 e 6, na ausência e na presença de cucurbit[7]uril (CB7). ESA (absorção no estado excitado), GSB (branqueamento), SE (emissão estimulada).

<i>p</i> -NH ₂ pBeet, 25% Gli/H ₂ O					<i>p</i> -NH ₂ pBeet, 25% Gli/H ₂ O pH 2				
	IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3		IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3
ESA, 442 nm	51	320	2.0 ps	25.9 ps	ESA, 442 nm	63	335	5.5 ps	34.5 ps
GSB, 541 nm	88	165	2.1 ps	31.3 ps	GSB, 535 nm	92	110	3.3 ps	32.7 ps
SE, 594 nm	68	80	0.86 ps	3.5 ps	SE, 594 nm	69	123	4.9 ps	36.4 ps
<i>p</i> -NH ₂ pBeet@CB7, 25% Gli/H ₂ O					<i>p</i> -NH ₂ pBeet@CB7, 25% Gli/H ₂ O pH 2				
	IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3		IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3
ESA, 442 nm	68	380	3.7 ps	81.7 ps	ESA, 442 nm	82	754	12.5 ps	63 ps
GSB, 541 nm	92	209	2.8 ps	72.8 ps	GSB, 535 nm	96	352	5.3 ps	54.8 ps
SE, 594 nm	58	383	2.9 ps	127 ps	SE, 594 nm	77	520	11.9 ps	64.2 ps
<i>p</i> -NH ₂ pBeet, 75% Gli/H ₂ O					<i>p</i> -NH ₂ pBeet, 75% Gli/H ₂ O pH 2				
	IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3		IRF /fs	τ_1	τ_2	τ_3
ESA, 442 nm	41	382	6.5 ps	17.6 ps	ESA, 442 nm	55	0.07 ps	6.2 ps	106 ps
GSB, 541 nm	88	132	4.3 ps	37.5 ps	GSB, 535 nm	104	0.07 ps	7.1 ps	140 ps
SE, 594 nm	40	83	1.0 ps		SE, 594 nm	36	2.6 ps	34.5 ps	159 ps
<i>p</i> -NH ₂ pBeet@CB7, 75% Gli/H ₂ O					<i>p</i> -NH ₂ pBeet@CB7, 75% Gli/H ₂ O pH 2				
	IRF /fs	τ_1 /fs	τ_2	τ_3		IRF /fs	τ_1	τ_2	τ_3
ESA, 442 nm	69	553	9.8 ps	271 ps	ESA, 442 nm	58	4.2 ps	76.3 ps	135 ps
GSB, 541 nm	94	183	6.9 ps	222 ps	GSB, 535 nm	102	0.18 ps	7.1 ps	115 ps
SE, 594 nm	71	331	30.4 ps	312 ps	SE, 594 nm	58	1.1 ps	7.2 ps	114 ps