

Universidad Nacional de Ingeniería

Facultad de Ciencias



TESIS

“Semisíntesis de la betaxantina BeetTris a partir de una betacianina (betanina, *Beta vulgaris*): evaluación de la estabilidad, actividad antirradical, citotoxicidad, e interacción con ADN”

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA**

ELABORADO POR

HECTOR AGUILAR VITORINO

ASESORA

Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

LIMA – PERÚ

2021

"La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso."

Louis Pasteur

Agradecimiento

A la Profesora Dra. *Ana Cecilia Valderrama Negrón*, por la confianza en la presentación de esta tesis.

Al Profesor Dr. *Erick Leite Bastos*, por el amplio conocimiento invertido en el desarrollo de trabajo.

Al Profesor Dr. *Breno Pannia Espósito*, por la amistad, conocimiento y uso desinteresado de su laboratorio de Investigación LAQBAM.

A la Profesora Dra. *Jum Sook Chung*, por el conocimiento, y uso desinteresado de su laboratorio de biología molecular.

A la Dra. *Priscila Ortega*, por la perseverancia compartida para la elaboración de esta tesis.

A la Mg. *Jéssica Bordotti Nobre Espósito*, por el soporte teórico-práctico en los ensayos celulares.

Al Dr. *Abraham Espinoza Culupú*, por el soporte teórico en biología molecular.

A mi amada madre, *Paulina Vitorino Quiñones*, por su esfuerzo, amor y sustento permanente para la elaboración de esta tesis.

A *Miguel Ángel Vargas Arque*, por la confianza en todo lo que realizo.

A *todos mis hermanos y sobrinos*, por su confianza.

Al *Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo*, e *Institute of Marine and Environmental Technology* por ceder la infraestructura para el desarrollo de este trabajo.

Al *Laboratorio BIOMET* de la *Facultad de Ciencias* de la *Universidad Nacional de Ingeniería*.

Al *pueblo brasileño (CAPES)*, *estadounidense (UMCES)* y *peruano* por el apoyo, a través de sus impuestos.

Finalmente, a todos los involucrados en la realización de esta tesis. ¡Muchas Gracias!

RESUMEN

Vitorino, H.A. “Semisíntesis de la betaxantina BeetTris a partir de una betacianina (betanina, *Beta vulgaris*): evaluación de la estabilidad, actividad antirradical, citotoxicidad, e interacción con ADN”. 2021. (81p). Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Lima, Perú.

La betanina (Bn) fue obtenida y purificada, a partir de la betarraga roja (*Beta vulgaris*), y la hidrólisis en pH básico fue estudiado, así como la interacción con una amina primaria en medio tamponado. Una betalaína artificial fue semisintetizada (BeetTris), a partir del acoplamiento aldímico de una amina primaria (Tris), y el ácido betalámico (HBt) obtenido de la hidrólisis básica del jugo de betarraga. La hidrólisis de BeetTris en pH básico, también fue estudiado. La capacidad antiradicalar fue determinada en equivalentes de TEAC, y la actividad citotóxica de las betalaínas fue estudiada en dos modelos de células inmortalizadas de cáncer cervical (HeLa) y de carcinoma hepatocelular (HepG2). Además, fue estudiada la interacción de las betalaínas con ADN extraído de bioindicadores marinos (*Callinectes danae*) por electroforesis en gel de agarosa, y analizado por secuenciamiento. La Bn mostró mayor estabilidad que BeetTris en medio alcalino, así como mayor carácter antiradicalar que el HBt y el BeetTris, este último(/s) mostró significativa citotoxicidad en células HeLa. El ADN no mostró desnaturalización en presencia de las betalaínas, pero el BeetTris(/HBt) interfirió en su amplificación. La Bn mostró afinidad por el ADN, originando un cambio de movilidad electroforética (Shift). Por otro lado, el BeetTris/HBt mostró interferencia en la identificación de ADN, esto debido a la supresión de fluorescencia de la sonda (bromuro de etidio), que formaría aductos derivados de sonda-betalaína. La hidrólisis de la Bn sobre tampón de amina primaria, puede formar subproductos que pueden ser menos estables, con menor capacidad antiradicalar, con alguna capacidad citotoxicidad, y pueden interferir con la amplificación e identificación del ADN en ensayos *in vitro*. Este modelo de betalaína artificial, puede sugerir una propuesta para estudios de los intermediarios inestables en medio alcalino, en las rutas biosintéticas que son estudiadas por biología molecular.

Palabras llave: betalaínas; hidrólisis; antiradicalar; citotoxicidad; electroforesis; secuenciamiento.

ABSTRACT

Vitorino, H.A. "Semisynthesis of betaxanthin BeetTris from a betacyanin (betanin, *Beta vulgaris*): evaluation of stability, antiradical activity, cytotoxicity, and interaction with DNA". 2021. (81p). Thesis (Degree). Faculty of Sciences - National University of Engineering, Lima, Lima, Peru.

Betanin (Bn) was obtained and purified from red beet (*Beta vulgaris*), and the hydrolysis at basic pH was studied, as well as the interaction with a primary amine in a buffered medium. An artificial betalain was semisynthesized (BeetTris) from the aldimine coupling of a primary amine (Tris), and the betalamic acid (HBt), obtained from the basic hydrolysis of beet juice. The hydrolysis of BeetTris at basic pH was also studied. The antiradical capacity was determined in TEAC equivalents, and the cytotoxic activity of betalains was studied in two immortalized cell models of cervical cancer (HeLa) and hepatocellular carcinoma (HepG2). Furthermore, the interaction of betalains with DNA extracted from marine bioindicators (*Callinectes danae*) was studied by agarose gel electrophoresis, and analyzed by sequencing. Bn showed greater stability than BeetTris in alkaline medium, as well as a greater antiradical character than HBt and BeetTris, the latter (or both latter) showed significant cytotoxicity in HeLa cells. The DNA did not show denaturation in the presence of betalains, but BeetTris (/ HBt) interfered with their amplification. Bn showed an affinity for DNA, causing a change in electrophoretic mobility (Shift). On the other hand, the BeetTris / HBt showed interference in the identification of DNA, due to the suppression of fluorescence of the probe (ethidium bromide), which would form adducts derived from probe-betalain. The hydrolysis of Bn on a primary amine buffer can form by-products that may be less stable, with less antiradical ability, with some cytotoxicity, and may interfere with DNA amplification and identification *in vitro* assays. This artificial betalain model can suggest a proposal for studies of the unstable intermediates in alkaline medium, in the biosynthetic pathways that are studied by molecular biology.

Keywords: betalains; hydrolysis; antiradical; cytotoxicity; electrophoresis; sequencing.

PRÓLOGO

La tesis de licenciatura presentada a continuación lleva el título de “Semisíntesis de la betaxantina BeetTris a partir de una betacianina (betanina, *Beta vulgaris*): evaluación de la estabilidad, actividad antirradical, citotoxicidad, e interacción con ADN”: la base de esta investigación inicia con la extracción de la betanina de la beterraga, como precursor para la semisíntesis de una betalaína artificial, y su posterior estudio de estabilidad, actividad antirradicalar, citotóxica e interacción con macromoléculas biológicas. Este trabajo ha sido descrito como parte de los requisitos para la obtención del título universitario de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Esta tesis se desarrolló con la asesoría de la Prof^a. Ana Valderrama. La pregunta principal del trabajo fue formulada en conjunto con la Dra. Priscila Ortega, Dra. Sook Chung y el Dr. Erick Leite Bastos. El proceso de investigación ha sido realizado de manera exhaustiva que nos ha permitido responder las inquietudes de las preguntas formuladas.

En el primer capítulo se realiza una introducción general, haciendo hincapié en la motivación de la investigación de la tesis y en las principales aplicaciones recientes de las betalaínas. En el segundo capítulo se describe algunos aspectos teóricos de la obtención de betalaínas, así como su actividad antirradicalar, antioxidante, estabilidad cinética, e interacción en sistemas biológicos relevantes. El capítulo III incluye el procedimiento de semisíntesis de la betalaína artificial y caracterización, el estudio de la estabilidad y la capacidad antirradicalar e interacción con sistemas biológicos. Además, se describe las técnicas e instrumentos empleados. A continuación, en el capítulo IV se centra en describir y discutir los resultados del estudio de la betanina y la betalaína artificial. La tesis finaliza con un breve capítulo dedicado a recoger las conclusiones más generales, y otro que incluye la bibliografía citada en los distintos capítulos. Como anexo se incluye una serie de resultados complementarios para enriquecer las discusiones de los resultados.

Hector Aguilar Vitorino

Lima, agosto de 2021

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS

MTS	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfohenyl)-2H-tetrazolium</i>
Tris	2- Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
AKR	5' – ACG CGC TTC TCA ATC TCG TTA – 3'
AKF	5' – CTA CCA CAA CGA CAA CAA GAC CTT C – 3'
HBt	Ácido betalámico
Hepes	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
A/T/G/C	Adenina, Timina, Guanina, Citosina
Bn	Betanina
ϵ	Coefficiente de atenuación molar
k_{obs}	Constante cinética observada
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de alta eficiencia
DAD	<i>Diode array detector</i> , detector de arreglo de diodos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ESI+	<i>Electrospray ionization</i> , ionización por electrón-spray en modo positivo
HRMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno
UV-Vis	Espectroscopía electrónica de absorción en el ultravioleta-visible
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Suero bovino fetal
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , cromatografía líquida de alta eficiencia
LSS	Lauril sulfato de sodio
λ^{max}	Longitud de onda de máxima absorción en el espectro UV – Vis
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
m/z	Razón masa/carga en espectroscopía de masas
PBS	Tampón de fosfato salino
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
$t_{1/2}$	Tempo de vida – media
t_R	Tiempo de retención

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades y problemática	1
1.2. Objetivo.....	3
1.3. Objetivos específicos.....	3
1.4. Hipótesis.....	3
2. CAPÍTULO II. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.1. Betalaínas: Aspectos generales	5
2.2. Fuentes de betalaínas.....	6
2.3. Actividad antiradicalar y antioxidante en betalaínas.....	8
2.4. Estabilidad de las betalaínas.....	9
2.5. Biosíntesis de betalaínas.....	11
2.6. Actividad biológica de las betalaínas	13
3. CAPÍTULO III. MATERIALES y MÉTODOS.....	16
3.1. REACTIVOS Y SOLVENTES.....	16
3.1.1. Solventes.....	16
3.1.2. Ácidos y bases.....	16
3.1.3. Reactivos químicos	16
3.2. MÉTODOS.....	17
3.2.1. Betarraga	17
3.2.2. Obtención de la Betanina	17
3.2.3. Obtención del ácido betalámico (HBt)	17
3.2.4. Obtención de la betaxantina artificial	18
3.2.5. Purificación de la betalaína	18
3.2.6. Análisis por cromatografía HPLC	19
3.2.7. Cromatografía de alta eficiencia acoplada a espectroscopia de masas	19
3.2.8. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹ H (RMN ¹ H)	20
3.2.9. Cinética de descomposición de las betalaínas	20
3.2.10. Obtención de las constante cinéticas observadas (<i>k</i> _{obs}).....	20
3.2.11. Capacidad antiradicalar	20
3.3. Ensayos Biológicos	21

3.3.1.	Ensayo con células inmortalizadas HeLa y HepG2	21
3.3.1.1.	Cultura celular	21
3.3.1.2.	Ensayos de viabilidad celular (MTS)	22
3.3.1.3.	Área de colecta de animales	23
3.3.1.4.	Animales	23
3.3.1.5.	Extracción del tejido del pedúnculo ocular	24
3.3.1.6.	Extracción del ARN del pedúnculo ocular	25
3.3.1.7.	Formación de ADNc a partir del ARN del pedúnculo ocular	27
3.3.1.8.	Ensayos de PCR.....	27
3.3.1.9.	Preparación de Gel de Agarosa y obtención de ADNc específico	28
3.3.1.10.	Ensayos con betanina pre- y pos-PCR.....	31
3.3.1.11.	Ensayos de secuenciamiento	32
3.4.	Análisis de los resultados	32
4.	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
4.1.	Obtención de la betanina	34
4.2.	Purificación de la betanina	35
4.3.	Descomposición de la betanina	40
4.4.	Descomposición de la betanina en medio tamponado con Tris	42
4.5.	Obtención del ácido betalámico	45
4.6.	Obtención de la betaxantina artificial.....	47
4.7.	Propiedades antioxidantes de las betalainas	49
4.8.	Ensayos en células humanas	52
4.9.	Ensayos de interacción con ADN.....	54
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7.	ANEXOS. MATERIAL SUPLEMENTARIO	76

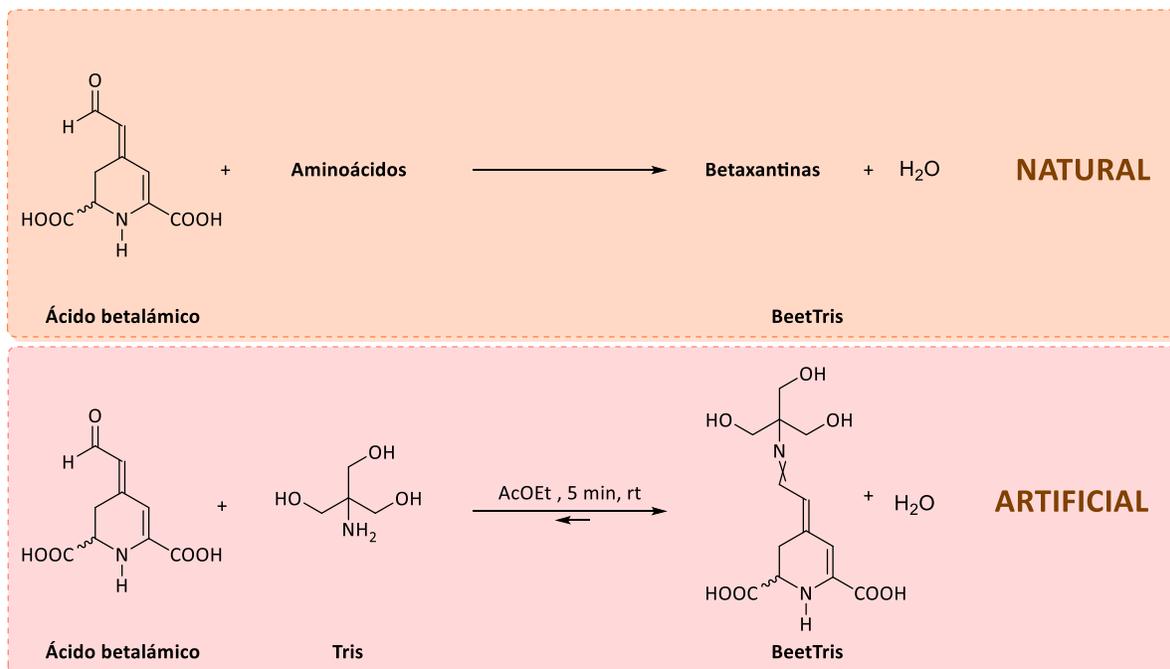
1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades y problemática

Las betalaínas son pigmentos vegetales vacuolares con actividad biológica, capaces de interactuar selectivamente con membranas celulares. Todas las betalaínas son productos de acoplamiento aldimínico entre el ácido betalámico, y aminas o aminoácidos. La obtención de este precursor permite la semisíntesis, es decir, síntesis parcial, de betalaínas naturales y artificiales que amplían la posibilidad de estudio de las propiedades y aplicación de estos pigmentos.

Las betalaínas son metabolitos secundarios derivados del aminoácido L-tirosina (**Esquema 2.3**). Experimentos en finales de los años 60 fueron los pioneros en trabajar con moléculas marcadas radioactivamente con la finalidad de demostrar su incorporación en unidades estructurales y así contribuir con un borrador inicial de la vía biosintética^{1,2}. Estudios teóricos y experimentales han propuesto el uso de estos extractos vegetales, además de la betanina, betanidina y ácido betalámico como fotosensibilizadores en celdas solares sensibilizadas por colorantes³⁻⁷. La formación de complejos de Bn:Eu(III) también han sido descritos, en una razón de 1:1 ($\beta = 5.2$)⁸. Este complejo tiene la capacidad de detectar las esporas de la bacteria *Bacillus anthracis*, causante del ántrax o carbunco, que es usada en ataques terroristas⁸. Otro estudio, muestra de cómo la betalaína, tomada como punto de partida para el desarrollo de sondas fluorescentes capaces de marcar eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*, agente que causa la malaria en humanos⁹.

En estudios previos a este trabajo, fue desarrollado, el 2018, una betalaína artificial fluorescente BeetTris, derivado del 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol. Esta betalaína artificial mostró capacidad de “marcar” la membrana de los núcleos aislados de las células de hepatopáncreas de cangrejos, y fue comparado con sondas comerciales como el Hoechst 33342 (azul) y yoduro de propidio (*PI*, rojo), utilizadas frecuentemente en ensayos de viabilidad celular y electroforesis en gel¹⁰ (**Esquema 1.1; Figura 1.1**).



Esquema 1.1. Síntesis de betalainas naturales y artificiales.

Las betalainas naturales y artificiales muestran una gran variedad de aplicaciones en sistemas biológicos con resultados interesantes, desde que sigan rutas de formación o preparación adecuada para evitar desarrollar un derivado que no sea tóxico o carcinogénico^{11,12}. Los ensayos a nivel celular o molecular, son desarrollados en medios tamponados que, con la finalidad de proporcionar medios biológicos relevantes, son usados tampones de aminas (tampón TAE o TBE contiene amina primaria). Citando un ejemplo, en 1989, cuando se estudiaba los intermediarios de la ruta biosintética de betalainas en *Amanita muscaria*, durante el proceso de extracción de enzimas, se descubrió una betalaina ($\lambda=476$ nm), que no fue caracterizada, ni reportada adecuadamente, y no formaba parte de la ruta biosintética de las betalainas¹³. Esta betalaina, fue recientemente caracterizada¹⁰, mostrando propiedades fluorescentes de marcación en núcleos celulares (**Figura 1.1**). A pesar, que esta betalaina no tiene una ruta biosintética biológicamente programada, esta puede ser formada artificialmente y/o “accidentalmente”. Además, esta puede interactuar indirectamente con moléculas biológicas, ya que puede proporcionar estabilidad al ácido betalámico (aldehído α,β -insaturado inestable) producto de la hidrólisis en medio alcalino (pH fisiológico) de las betalainas.

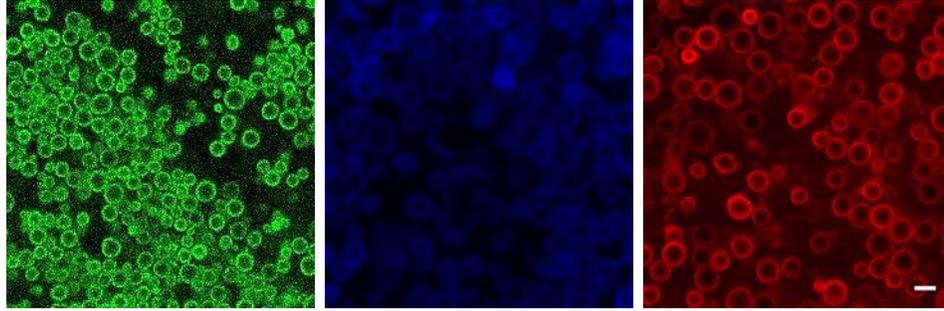


Figura 1.1. Microscopía de fluorescencia de células de hepatopáncreas de *Callinectes danae* incubada con BeetTris (**verde**), Hoechst 33342 (**azul**) y PI (**rojo**). La barra blanca indica una escala de $2 \mu\text{m}^{10}$.

1.2. Objetivo

Estudiar los efectos de subproductos originados por la hidrólisis de la betanina en medios biológicos.

1.3. Objetivos específicos

- Aislamiento y purificación de la betanina, a partir de la betarraga *Beta vulgaris*.
- Obtención del ácido betalámico, mediante a hidrólisis alcalina de la betanina.
- Obtención de una betaxantina artificial a partir de la betanina y ácido betalámico.
- Estudio de actividad antiradicalar, citotóxico e interacción con ADN en medio biológico de las betalaínas natural (betanina) y artificial (BeetTris).

1.4. Hipótesis

- La betalaína artificial obtenida y caracterizada será menos estable cinéticamente que la betanina debido a que no presenta la fracción catecol.
- La capacidad antiradicalar de la betanina será mayor que la betalaína artificial debido a la ausencia de la fracción catecol.
- La betalaínas natural, y artificial, por tener un carácter antioxidante, no presentarán actividad citotóxica frente a los modelos celulares HeLa y HepG2.

- Las betalaínas interactuarán con las macromoléculas de ADN o ARN vía formación de bases de shift.

2. CAPÍTULO II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Betalaínas: Aspectos generales

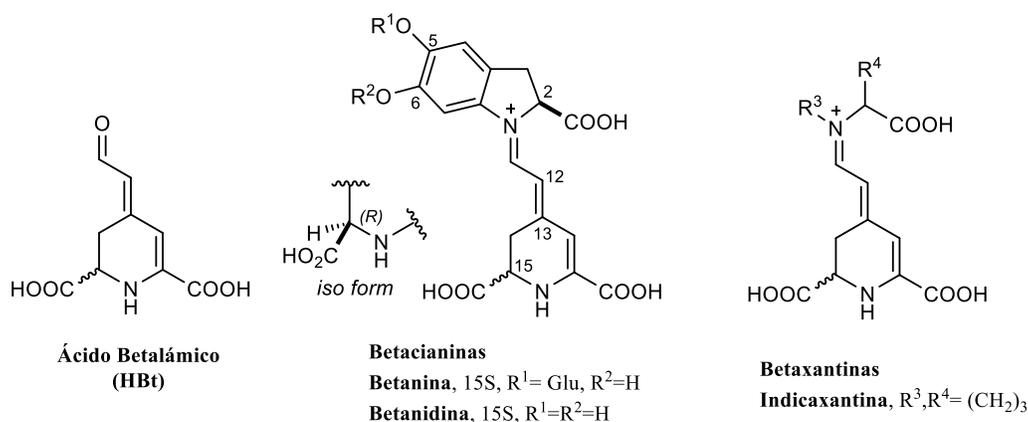
Los pigmentos vegetales[‡] son fundamentales en el mantenimiento de la vida, dada su participación en la comunicación entre especies e en el aprovechamiento de la luz solar¹⁴. En el reino vegetal, hay sustancias químicas coloridas que componen una paleta que excluye solamente el blanco y el negro¹⁵. Esta gran variedad de colores fue resultado de adaptaciones ecológicas de las plantas a las alteraciones del medio ambiente¹⁶.

El color de las flores son casi exclusivamente debido a la presencia de antocianinas, carotenos y betalaínas¹⁵⁻¹⁷. Las betalaínas son menos investigadas que las antocianinas y carotenos, debido a su origen natural restringido¹⁸.

Las betalaínas son pigmentos naturales atóxicos solubles en agua responsables no solo de la coloración brillante de las frutas y flores, sino también de las raíces y hojas de las plantas que pertenecen al orden *Caryophyllales*¹⁹⁻²¹. En este orden, las únicas excepciones son las *Caryophyllaceae* y *Molluginaceae*, donde la coloración se debe a las antocianinas²². Las betalaínas y las antocianinas son dos familias diferentes de pigmentos que nunca se encuentran juntas en la misma planta. Las razones evolutivas de la aparente exclusión mutua no se han explicado adecuadamente; sin embargo, a nivel bioquímico, se ha demostrado que las enzimas relevantes para la producción de antocianinas no se expresan en plantas productoras de betalaína^{23,24}. La presencia de betalaínas en las flores es particularmente interesante debido a la importancia del color en la atracción de animales para la polinización^{25,26}. Las flores son de color violeta o amarillo brillante en función de la presencia de betacianinas o betaxantinas, respectivamente. La presencia conjunta de los pigmentos genera tonos naranjas a rojo y también son posibles patrones abigarrados^{27,28}.

[‡] EL concepto de colorante y pigmento está relacionado a la solubilidad. En inglés, colorants (colorantes) son sustancias que absorben o emiten luz en la región del espectro visible (400 – 700 nm). Los colorantes pueden ser *dyes* (tintes) o *pigments* (pigmentos), términos que muchas veces son utilizados indiscriminadamente. Los pigmentos son prácticamente insolubles en el medio al cual son aplicados. En productos naturales, sustancias responsables por la coloración de tejidos vegetales y animales son llamados de pigmentos. Colorantes, por otro lado, son solubles o parcialmente solubles en el medio. En el español, estos términos pueden ser tratados como sinónimos. Entonces, como las betalaínas son o se originan de productos naturales, en el texto se va referir a estas como pigmentos³⁰.

Las betalaínas se dividen en dos clases, dependiendo del aminoácido del cual se originan: betacianinas (Griego: *kyaneos*=azul, rojo – violeta, $\lambda_{\text{abs}} \approx 540 \text{ nm}$) y betaxantinas (Latín: *beta* = betarraga; Griego: *xanthos* =amarillo, amarillo – anaranjado, $\lambda_{\text{abs}} \approx 470 \text{ nm}$)²⁹. Las dos clases de betalaínas conocidas poseen un sistema conjugado 1,7-diazaheptametínico (1,7-dHm) como cromóforo que se origina de la biosíntesis a partir del ácido betalámico, un aldehído α,β -insaturado inestable³⁰. Las betaxantinas son iminas o cationes iminio que se originan del acoplamiento espontáneo (imino condensación) entre el ácido betalámico y aminas o aminoácidos esenciales (acoplamiento aldimínico). Por otro lado, las betacianinas son producto de la condensación entre el ácido betalámico y derivados glicosilados y/o acilados del ciclo-DOPA (*ciclo-3-(3,4-dihidroxifenilalanina)*)³¹ (**Esquema 2.1**).



Esquema 2.1. Estructura del ácido betalámico (HBt), betacianinas y betaxantinas.

2.2. Fuentes de betalaínas

Las betalaínas se encuentran en partes comestibles de las plantas, y en sus hojas³², flores²¹, tallos³³ y brácteas³⁴. Las betalaínas y antocianinas nunca se han encontrado juntas en la misma planta^{35,36}; en los *Caryophyllales* solo la coloración de las *Caryophyllaceae* y *Molluginaceae* se debe a las antocianinas. Entre las plantas de *Caryophyllales*, las raíces de la betarraga roja (*Beta vulgaris*)³⁷, los frutos de cactus (tuna) pertenecientes al género *Opuntia* (principalmente *Opuntia ficus indica*)^{27,38}, las frutas del dragón de los cactus *Hylocereus*, pitaya (principalmente *Hylocereus*

polyrhizus, pitaya roja)^{39,40}, y la acelga (*Beta vulgaris*)⁴¹ son fuentes comestibles conocidas de betalaínas.

Las fuentes menos comunes de encontrar betalaínas son los tubérculos ulluco (*Ullucus tuberosus*)¹⁹, los frutos de los cactus *Eulychnia*⁴² y las bayas de *Rivina humilis*⁴³. Ciertas especies de *Amaranthus* también se consumen cocidas o frescas^{44,45}. Una fuente interesante de betalaína es la *Amanita muscaria*, agario de moscas o mata moscas, este hongo alucinógeno, comparte una serie de toxinas (ácido iboténico, muscimol y muscazón) que hacen esta especie venenosa en altas concentraciones^{46,47}. Los extractos de betarraga que contienen betalaína se usan como aditivos para dar un color rosa o violeta en alimentos y bebidas, bajo el código E-162, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los EE. UU.⁴⁸⁻⁵¹ (**Figura 2.1**).

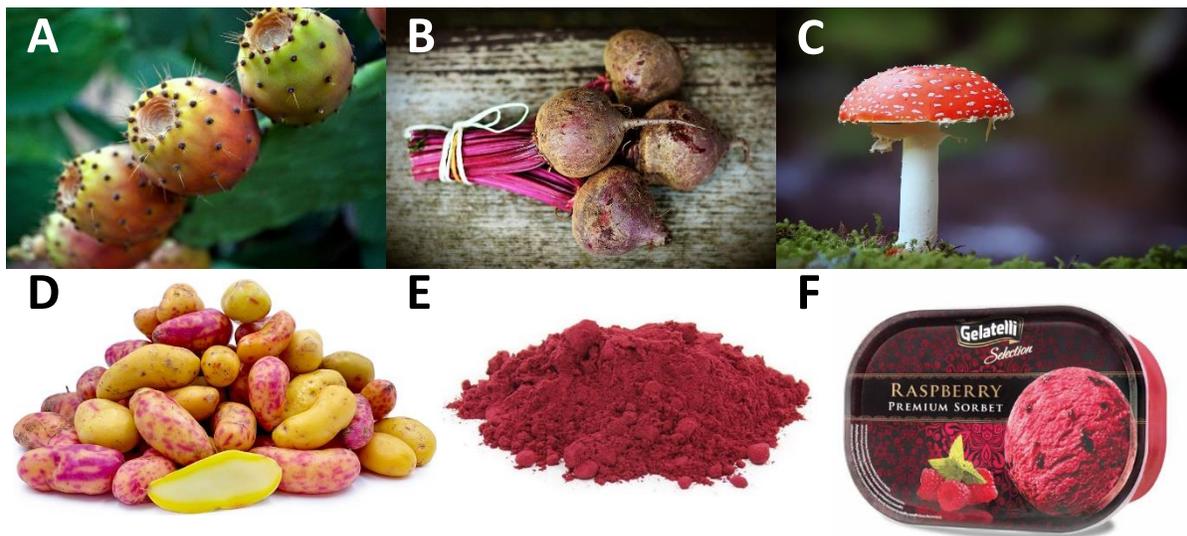


Figura 2.1. Fuentes conocidas de betalaínas: fruta *Opuntia ficus-indica* (A) betarraga *Beta vulgaris* (B), hongo alucinógeno *Amanita muscaria* (C), y tubérculos ulluco (D). Colorante comercial (E-162) extraído de la betarraga *Beta vulgaris* (E), y producto lácteo que contiene extractos de *B. vulgaris* (F). (Fotos: pixabay.com, allnuts.com.br, wogibtswas.at)

Las betalaínas han mostrado en los últimos años un potencial bioactivo prometedor. Investigaciones han revelado una fuerte capacidad de eliminación de radicales libres a partir de betalaínas purificadas de la beterraga^{52,53}. Estudios posteriores revelaron la existencia de una actividad intrínseca presente en todas las betalaínas modulada por factores estructurales, la capacidad de eliminación de radicales libres generalmente aumenta con el número de grupos hidróxilo/imino, y además depende de la posición de estos grupos, y la glucosilación y de aglicones

en las moléculas de las betalainas^{31,54}. Experimentos *in cellulo* con diferentes líneas celulares (leucemia mieloide K562 y melanoma B16F10) han demostrado el potencial de las betalainas en la quimiopreención del cáncer^{55,56}, y experimentos *in vivo* han demostrado que concentraciones muy bajas de pigmentos dietéticos inhiben la formación de tumores en ratones⁵⁷⁻⁵⁹. En humanos, la concentración plasmática de betalainas después de la ingestión es lo suficientemente alta como para promover su incorporación a los glóbulos rojos y al LDL (lipoproteína de baja densidad), protegiéndolas del daño oxidativo y la hemólisis⁶⁰⁻⁶². Sin embargo, la mayoría de las actividades biológicas descritas se han informado según estudios con extractos de plantas con purificación de pigmento limitada o nula. Aunque estos estudios son útiles para identificar actividades potenciales, los compuestos aislados son necesarios para vincular los efectos descritos con las estructuras responsables.

2.3. Actividad antirradicalar y antioxidante en betalainas

Desde la introducción de una tecnología factible para determinar el potencial de eliminación de radicales libres de moléculas y extractos por el grupo Rice-Evans⁶³, el ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) ensayo radical se ha convertido en una técnica estándar en la evaluación de esta actividad. En las betalainas, el ensayo radical ABTS ha ganado relevancia con respecto a otras metodologías similares, como el ensayo radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)⁶⁴ y el ORAC (capacidad de absorción del radical de oxígeno)⁶⁵, o la reducción directa de Fe(III) a Fe(II) mediante el ensayo FRAP (poder antioxidante reductor férrico)⁶⁶ o el ensayo DHR (velocidad de formación de DR)^{10,67}. Esto se debe al uso de un medio completamente acuoso, la posibilidad de variación del pH y la falta de interferencias de señal con sondas fluorescentes. Los conceptos antioxidantes y antirradicales con frecuencia no se diferencian en la literatura. Se puede considerar que los antirradicales o radical scavengers son moléculas antioxidantes medidas experimentalmente en la reducción de un radical. El término antirradical[§]

[§] Cabe destacar que existe una diferencia entre la actividad "antirradical" y la "antioxidante". La actividad antirradical caracteriza la capacidad de los componentes para reaccionar con los radicales libres (en una reacción de radicales libres), pero la actividad antioxidante representa la capacidad de inhibir el proceso de oxidación (que generalmente implica un conjunto de reacciones diferentes)¹⁶⁴. John Gutteridge y Barry Halliwell en su libro (Free Radicals in Biology and Medicine) mencionan que "antioxidante es un término ampliamente utilizado, pero raramente definido"¹⁶⁵, estos autores proponen definir un antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o impide significativamente la oxidación de ese sustrato"¹⁶⁵. Esta definición cubre todos los procesos de oxidación, tanto radicales como no radicales. Pero, como se señaló en otra parte, "una definición genérica de antioxidante no es experimentalmente constructiva a menos que esté asociada con la noción de oxidante que debe neutralizarse"¹⁶⁶. Además, la validez del término "antioxidante" depende del entorno de su acción, a saber, si consideramos una acción *in vitro* o *in vivo*.

se usa (en esta sección) cuando la actividad se ha evaluado mediante un ensayo basado en radicales (ABTS, DPPH, ORAC) independientemente de los términos originales utilizados por los autores. El término antioxidante estará restringido a experimentos que no involucren radicales estables⁶⁸.

Investigaciones han demostrado la actividad antiradicalar de betalaínas purificadas de la betarraga *B. vulgaris*, cuando estas fueron separadas en betacianinas y betaxantinas⁵³. Otros trabajos demostraron actividades en betalaínas purificadas de diferentes fuentes: betarraga *B. vulgaris* cultivadas en condiciones axénicas⁶⁹, *Opuntia ficus-indica*⁷⁰, y plantas de *Amaranthaceae*⁵⁴. En todos los casos, la actividad de eliminación de radicales determinada fue mayor que la detectada para otros compuestos bien conocidos como ácido ascórbico, catequina y Trolox. De esa forma, se ha demostrado que la glucosilación de betacianinas reduce la actividad de los pigmentos⁵⁴ debido al bloqueo de uno de los grupos hidroxilo. Sin embargo, la presencia de estos grupos no es necesaria para expresar la actividad, en contraste con los resultados obtenidos para los flavonoides, donde la ausencia de actividad se ha descrito en los compuestos deshidroxilados *trans*-chalcona, flavona, flavanona e isoflavona⁷¹.

2.4. Estabilidad de las betalaínas

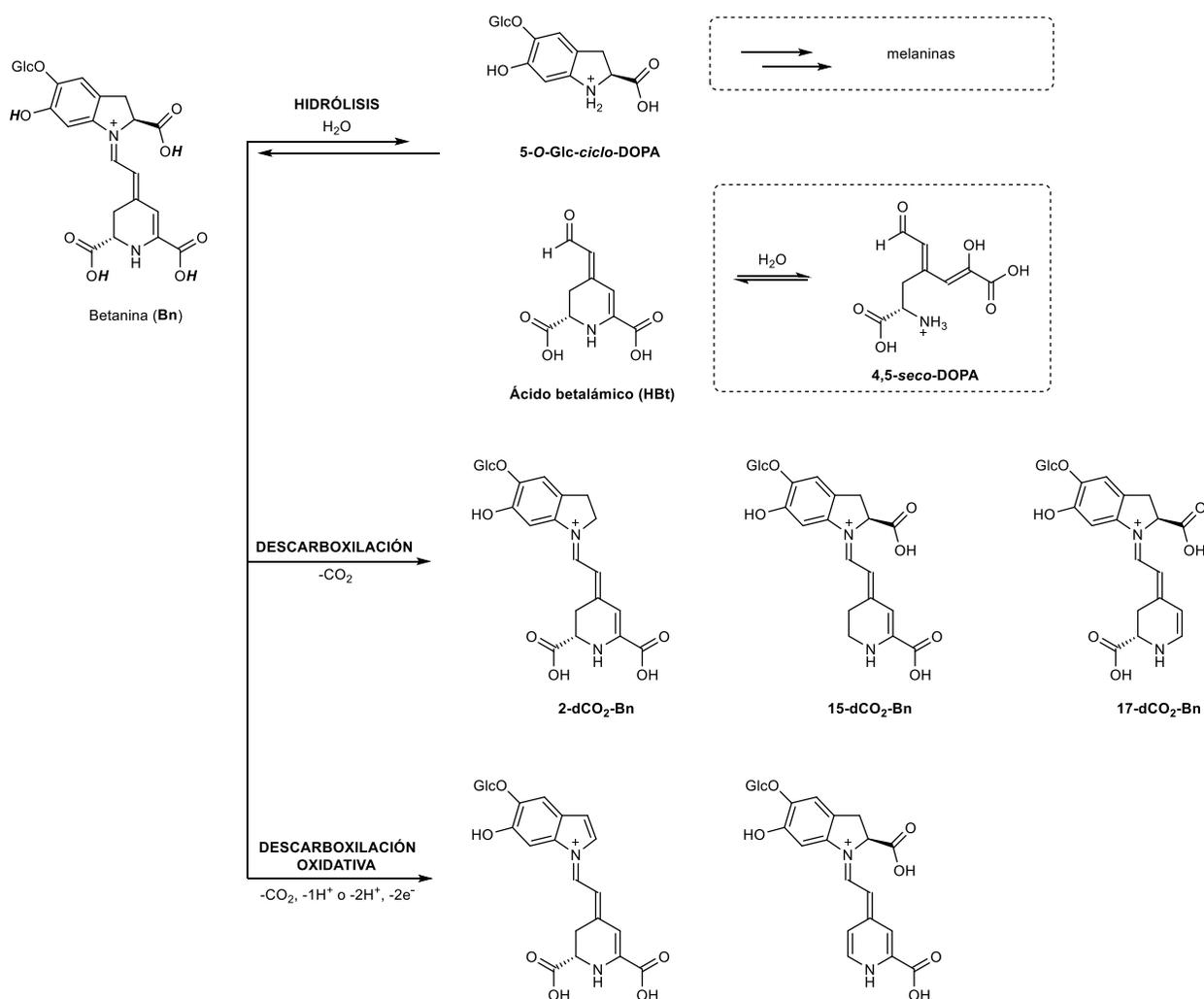
La modificación química de alimentos está generalmente asociada a los cambios de color, lo que compromete frecuentemente al sector comercial, a los beneficios para la salud, y la seguridad⁷². Con la finalidad de mantener los colores en los alimentos, donde las betalaínas son usadas como colorantes, la manipulación, el procesamiento y almacenamiento deben ser realizados en condiciones controladas. La estabilidad de las betalaínas es influenciada por factores intrínsecos (composición y estructura)⁷³, así como a sus factores extrínsecos (temperatura, oxígeno, luz, pH, actividad del agua, actividad enzimática)⁷⁴⁻⁷⁸.

La temperatura es uno de los factores más importante en la degradación de las betalaínas⁷⁵. La conservación de los alimentos, incluye por lo general un tratamiento térmico de las materias primas, y de esa forma es posible garantizar la seguridad de los alimentos. En ese sentido, se han realizado varios estudios para obtener información de la degradación térmica de las betalaínas en los extractos de beterraga⁷⁹⁻⁸². La estabilidad de las betalaínas depende del tiempo de la temperatura y tiempo de calentamiento. Otros factores que influyen la velocidad de

descomposición térmica de las betalaínas son la estructura del pigmento, pH, presencia de luz, y oxígeno. Es por estos factores que las betaxantinas son menos estables que las betacianinas^{82,83}. Por ejemplo, la betanina (betaxantina, $k_{\text{obs}} = 6,9 \times 10^{-4} \text{ h}$, $t_{1/2} = 996 \text{ h}$) hidroliza con mayor rapidez (casi ocho veces más rápido) que la indicaxantina (betacianina, $k_{\text{obs}} = 5,3 \times 10^{-3} \text{ h}$, $t_{1/2} = 130 \text{ h}$) en agua a pH neutro y a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁸⁴.

Las betalaínas son relativamente estables entre pH de 3 a 7¹⁶. El pH óptimo para la estabilidad de la betanina está entre 5.5 y 6.0, en presencia de oxígeno, y entre 4 y 5, en condiciones anaeróbicas⁸⁵. Por otro lado, las betaxantinas son más estables a pH entre 4 y 7, siendo el pH de 5.5 el óptimo de estabilidad⁸⁶. En pH por debajo de 3.5, el máximo de absorción es desplazado para longitudes de onda menores, y por encima de 7, es desplazado para longitudes de onda mayores⁸⁵.

Las betalaínas, cuando se encuentran en condiciones alcalinas, ocurre la hidrólisis del enlace aldimínico, y en condiciones ácidas se puede dar la recondensación del ácido betalámico, tanto con aminoácidos para producir betaxantinas, o con derivados del *ciclo*-DOPA para producir betaxantinas⁸⁷. En condiciones muy alcalinas (pH 14), la hidrólisis de la betanina ocurre instantáneamente, a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁸⁸. La mayoría de betalaínas son sensibles a sufrir hidrólisis en agua, y en solventes orgánicos próticos, como el metanol y etanol, ya que son formalmente iminas o sales de imino^{74,89,90}. La degradación de estos pigmentos puede ocurrir por diversos mecanismos⁸⁸. Diversos estudios, han podido caracterizar productos de la descomposición betanina por acción del tratamiento térmico: productos obtenidos deshidrogenados, descarbonizados y de hidrólisis^{72,82,91-93} (**Esquema 2.2**).



Esquema 2.2. Principales productos de la descomposición de la betanina por hidrólisis y descarboxilación⁸⁸. Los protones más ácidos de la betanina están marcados en *negrita cursiva*.

2.5. Biosíntesis de betalainas

Las betalainas se sintetizan a partir de la tirosina, un aminoácido aromático que se produce principalmente en las plantas a través de la vía shikimate* (**Esquema 2.3**)^{94,95}. La tirosina se

*La vía shikimate lleva el nombre de su intermedio central, ácido shikímico, que se aisló por primera vez de los frutos de anís (*Illicium anisatum*) en 1885 y recibió su nombre del nombre japonés de la planta shikimi - no - ki. A su vez, el ácido shikímico (shikimate en forma aniónica) ha dado lugar al nombre común de la vía, que también se conoce como la vía de biosíntesis de corismato¹⁶⁷. La vía shikimate consiste en siete reacciones enzimáticas cuyo producto final, el corismato, es el precursor de la síntesis de los aminoácidos aromáticos L-Triptófano, L-Fenilalanina y L-Tirosina¹⁶⁷. En hongos y plantas, el corismato es un precursor de muchos metabolitos especializados (es decir, metabolitos secundarios) que juegan un papel importante en la interacción de la planta con su entorno. La vía shikimate y la biosíntesis de aminoácidos aromáticos se han estudiado ampliamente en una variedad de microorganismos, hongos y plantas¹⁶⁸. Estas vías combinadas han sido objeto de considerable atención de investigación debido al hecho de que los mamíferos no pueden sintetizar estos aminoácidos y al hecho de que una de las enzimas de la vía shikimate es un objetivo herbicida muy efectivo. Sin embargo, además de estas características, estas vías también proporcionan precursores importantes para una amplia

hidroxila inicialmente para formar 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA)⁹⁶. L-DOPA se convierte posteriormente en ácido betalámico, la columna vertebral central de todos los compuestos de betalaína, en una reacción de dos pasos iniciada por la enzima DOPA 4,5-dioxigenasa^{97,98}. Alternativamente, L-DOPA se oxida y se cicla a ciclo-DOPA, que se condensa espontáneamente con ácido betalámico formando el precursor de betacianina betanidina⁹⁹. La betanidina se glucosila a continuación en la posición 5'O o 6'O para formar betanina o gomfrenina, respectivamente, lo que a su vez puede pasar por reacciones de glicosilación y acilación adicionales, lo que lleva a la síntesis de una amplia variedad de compuestos de betacianina¹⁰⁰. Se produce una variación de la ruta central hacia la formación de betanina en algunas especies de *Caryophyllales* (por ejemplo, *Mirabilis jalapa*, *Celosia cristata*), donde el ciclo-DOPA se glucosila primero en la posición 5'O, seguido de la condensación del ciclo-DOPA-5-O -glucósido con ácido betalámico para producir directamente betanina^{101,102}. La formación de las betaxantinas amarillas se produce por condensación espontánea de ácido betalámico con aminoácidos u otras aminas, en lugar de con derivados de ciclo-DOPA o ciclo-DOPA⁹⁹. Se cree que las betalaínas se sintetizan en el citoplasma y el retículo endoplásmico, basándose en la localización subcelular de sus enzimas biosintéticas clave^{97,103,104}. Al igual que muchos otros metabolitos secundarios de las plantas, finalmente se almacenan en la vacuola como glucósidos¹⁰⁵. En esta sección revisamos el conocimiento actual con respecto a los pasos catalizados por enzimas y la regulación transcripcional de la ruta biosintética, así como el catabolismo de betalaína.

gama de metabolitos secundarios importantes, que incluyen ácido clorogénico, alcaloides, glucosinolatos, auxina, taninos, suberina, lignina y lignano, tocoferoles y betalaínas¹⁶⁹.

tumores pulmonares, y en cáncer de piel originado por UVB⁵⁷. Otros estudios también mostraron que dosis semejantes pueden inhibir significativamente otros tipos de tumor en forma simultánea. Entre estos, hepatocarcinogénesis en fase 2, iniciado por NDEA (N-nitrosodietilamina) y promovido por fenobarbital⁵⁷. Basado en estos estudios, autores sugieren que el uso de la betanina para combatir la malignidad. Mecanismos de actividad anticancerígena sugieren que la betanina aumenta la expresión de caspasa-3 para inducir apoptosis¹⁰⁷.

Estudios anteriores *in cellulo* mostraron actividad antiproliferativa de la betanina contra varias líneas celulares con valores de IC₅₀ que van desde 142 a 164 µg/mL¹⁰⁸. La citotoxicidad de la betanina (IC₅₀ 40 µmol L⁻¹) contra las células de leucemia mieloide crónica humana K562, se ha mostrado a través de eventos celulares como la liberación de citocromo C en el citosol, escisión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la desregulación de Bcl-2, y la reducción en los potenciales de membrana mitocondrial⁵⁵. Otros estudios han mostrado que la betanina provocó la activación del iniciador caspasa-9, efector caspase-3 y -7, y la escisión de caspasa-3 objetivo de PARP como se evidenció en células de cáncer de pulmón humano¹⁰⁷. Del mismo modo, la betanina, así como la isobetanina han mostrado activación de vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7)¹⁰⁹. Todos los datos anteriores, obtenidos de estudios en ratones, líneas celulares de cáncer de pulmón, cultivos de células leucémicas mieloides y línea celular de cáncer de mama, sugieren claramente el efecto anticancerígeno de la betanina a través de la apoptosis.

Por otro lado, betaxantinas tales como la indicaxantina ha mostrado actividad antiapoptosis que dependen de la concentración, la fisiología y el tipo de célula afectada. Por ejemplo, con 2.5 µmol L⁻¹ de indicaxantina, se ha demostrado una cadena de eventos antiapoptóticos, incluida la inhibición de la actividad basal de NADPH oxidasa-4 (NOX-4), así como la sobreexpresión, represión de NF-κB, manteniendo el equilibrio redox celular y la homeostasis de Ca²⁺, y manteniendo los potenciales de membrana mitocondrial¹¹⁰. En células de carcinoma colorrectal (Caco-2), la indicaxantina (115 µmol L⁻¹), fue capaz de mostrar un efecto proapoptótico, a través de la reactivación del promotor de un gen oncosupresor que resultó en la acumulación de su producto proteico que controla el ciclo celular¹¹¹.

Entre los estudios revisados en esta sección hay cierta inconsistencia sobre las concentraciones de betalaínas en los ensayos de cultivo celular. Aunque no hay toxicidad asociada

con el consumo de betalaína, el crecimiento de cultivos celulares puede inhibirse a ciertas concentraciones de tratamiento. Se consideró que la indicaxantina era citotóxica para las células no proliferantes (endoteliales)¹¹² y las células Caco-2 proliferantes¹¹¹ a una concentración superior a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que la fracción de betaxantina era citotóxica ($\text{IC}_{50} 39 \mu\text{mol L}^{-1}$) a células proliferativas de carcinoma hepático (HepG2)⁴³. Aunque el efecto citotóxico varía con el tipo de célula y la duración de exposición, estos informes deben tenerse en cuenta mientras decide las dosis para los ensayos que incluyen betaxantinas (indicaxantina). Las betacianinas (hasta $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) generalmente no son tóxicas cuando los cultivos celulares en proliferación se exponen a esta durante 24 horas o más^{11,43,109,112}. En caso de células no tumorales¹¹³, se ha observado la citotoxicidad de betanina con concentraciones superiores a $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra el hepatoma y células de adenoma^{113,114}. Además, la toxicidad de la fracción de betacianina extraída de *Rivina humilis* ($\text{IC}_{50} 31 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Khan y otros 2012) o betanina de *Beta vulgaris* ($\text{IC}_{50} 360 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Lee y otros 2014) o $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ¹¹³ en cultivos de células HepG2 se ha observado después de exposición prolongada.

3. CAPÍTULO III. MATERIALES y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS Y SOLVENTES

3.1.1. Solventes

Todos los solventes orgánicos utilizados, acetado de etilo (Sigma – Aldrich, 99.5% v/v), metanol (Sigma – Aldrich, 99.8% v/v), DMSO (Sigma – Aldrich, 99.9% v/v), acetona (Sigma – Aldrich, 99.5% v/v), acetonitrilo (MeCN, Merck, Alemania, 99.9% v/v), Isopropanol (Sigma – Aldrich, 99.5% v/v), cloroformo (Sigma – Aldrich, para PCR, >99% v/v) y agua deuterada (Sigma – Aldrich, D: 99.9%), no fueron tratados previamente. El agua empleada en todos los experimentos fue sometido a osmosis reversa y desionizada (ultrapura, Tipo 1, Milli-Q, resistividad = 18.2 MΩ (Millipore, Billerica, MA).

3.1.2. Ácidos y bases

Ácido clorhídrico concentrado (Sigma – Aldrich, 36.5 – 38%), ácido fórmico (HCO₂H, Sigma – Aldrich, >95%), hidróxido de amonio (Sigma – Aldrich, 28 – 30%), hidróxido de sodio (NaOH, Synth, >95%), ácido acético glacial (Sigma – Aldrich, >99%) fueron para ajustar el pH, hidrólisis o catálisis cuando fueron necesarios.

3.1.3. Reactivos químicos

Sephadex LH-20 (St. Louis, MO) fue utilizado para la purificación de la betanina. Cloruro de sodio (Sigma – Aldrich, 99.9%), cloruro de potasio (Sigma – Aldrich, >99.9%), HEPES (Sigma – Aldrich, >99.5%), acetato de sodio (Sigma – Aldrich, >99%), Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro (Merck, >99.9%), sodio fosfato monobásico (Sigma – Aldrich, BioReagent, >99.0%), tris base (Merck, >99.8%), lauril sulfato de sodio (Merck, Supelco, >99%), Trolox (Sigma – Aldrich, 97%), ABTS (Merck, >98% (HPLC)), EDTA (Sigma – Aldrich, BioUltra, >99.0%).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Betarraga

Betarragas frescas (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), comúnmente conocido como betarraga roja, fue obtenido en un mercado local en Butantã, Sao Paulo, SP, Brasil.

3.2.2. Obtención de la Betanina

La betanina fue obtenida directamente, a partir de betarragas frescas (500 g) que fueron procesados en un extractor (Mondial – Turbo Juicer, modelo CF – 06) para obtener el jugo de betarraga. En seguida, este fue centrifugado (10 min, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $7000\times g$), y filtrado sobre un filtro de paño de algodón 100% (10 cm x 8 cm x 16 cm, $20\text{ }\mu\text{m}$). Luego el jugo es recogido, para nuevamente ser filtrado en una columna (1.5 cm x 20 cm) con cerca de 15 g de sílicagel C18 (RPC) a presión reducida (20 psi). El pH del filtrado es ajustado hasta 2 con adición de HCl concentrado. La solución fue distribuida en tubos Falcon de 50 mL (Corning®) con isopropanol en una proporción 2:1, los cuales fueron colocados rápidamente en un baño de hielo seco y etanol durante 20 minutos, y mantenidos sobre refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de 96 h, los tubos fueron retirados del freezer y centrifugados (15 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5000\times g$). En esta etapa se observó la formación de un precipitado en el fondo del tubo. Entonces, el sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue resuspendido en etanol, y los tubos fueron nuevamente centrifugados (10 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5000\times g$). El sólido formado fue disuelto en agua y centrifugado (5 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5000\times g$). Finalmente, fue obtenido el sobrenadante conteniendo betanina¹¹⁵.

3.2.3. Obtención del ácido betalámico (HBt)

El ácido betalámico fue obtenido por medio de la hidrólisis alcalina de las betalaínas presentes en el jugo de betarraga. Así, 400 mL de jugo de betarraga, previamente obtenido como indica en **3.2.2**, fue enfriado a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre hielo seco, y con agitación mecánica (350 rpm). El pH del sumo de betarraga fue mantenido entre 11.65 – 11.75, con adición controlada de NH_4OH 30%. El sistema fue mantenido sobre agitación hasta que la solución alcance un color amarillo brillante.

Luego, la solución fue enfriada hasta 0 – 2 °C y, rápidamente se adicionó HCl 37% hasta alcanzar un pH de 1.0 – 1.5. La agitación fue interrumpida e la solución amarilla fue transferido a una pera de separación de 1.0 L, y rápidamente fue adicionado 140 mL de acetato de etilo helado (<0 °C). La pera de decantación, tapada, fue agitada vigorosamente por 30 s. Después de 30 s de separación la fase inferior acuosa fue reservada para una segunda extracción, pero con adición de 100 mL de acetato de etilo. La fase superior orgánica, fue obtenido por la parte superior de la pera de decantación. En seguida, esta fue distribuido en tubos Falcon de 50 mL, y centrifugados a 7000 ×g durante 5 min. La fase orgánica de color amarillo fue separada con auxilio de una pipeta *Pasteur* de vidrio. El proceso de extracción fue repetido para la fase orgánica separada de la segunda extracción. El ácido betalámico extraído de la fase orgánica (dos extracciones) fue congelado en un baño de hielo seco. Esta solución final fue filtrada rápidamente con ayuda de un embudo de *Büchner* para eliminar el agua y la sal de la suspensión⁸⁸.

3.2.4. Obtención de la betaxantina artificial

10 mL de HBt (1.0 mmol L⁻¹) disuelto en AcOEt a 5 °C, fue colocado en un recipiente de vidrio de 20 mL con tapa y sobre agitación magnética, fue adicionado 4.8 mg de Tris base. La mezcla reaccional fue agitada por 20 min, y dispersada por ultrasonido a T < 10 °C. El sólido dispersado cambió de color de blanco a amarillo intenso, lo que indicó la formación de la betaxantina artificial (BeetTris)¹⁰. La mezcla fue almacenada a T < – 20 °C por 24 h. El sólido, luego de la completa reacción (amarillo – anaranjado) fue centrifugado a 14 000 rpm por 5 min a 0 °C, en un tubo de teflón. El solvente (amarillo – pálido) es retirado con una pipeta de vidrio, y el sólido fue lavado (3×) con 10 mL de AcOEt helado (– 20 °C), para retirar el exceso de HBt, y fue nuevamente centrifugado (3×) para separar el sólido. Finalmente, el sólido anaranjado es secado con ayuda de N₂, y almacenado a – 20 °C, en ausencia de luz y oxígeno.

3.2.5. Purificación de la betalaína

El ácido betalámico no fue purificado inicialmente, ya que al obtener la betaxantina artificial, el producto final fue purificado. Entonces, el sólido amarillo-anaranjado (BeetTris), fue disuelto en 1 mL de agua Milli-Q, y fue purificado, a través de una columna (1.5 cm × 20 cm) con

cerca de 15 g de Sephadex LH20 a presión reducida (20 psi). El agua (eluyente), tuvo un flujo de 4 mL min⁻¹. Finalmente, la fracción amarilla intensa fue colectada y congelada con EtOH/CO₂ (T<70 °C). La el sólido, finalmente fue liofilizado. La fracción restante fue retirada de la columna con ayuda de MeOH y agua, para su regeneración.

3.2.6. Análisis por cromatografía HPLC

La betalaína purificada fue analizado en un HPLC-UV-Vis Shimadzu 20A, acoplado a un detector PDA SPD-M20A en fase reversa. Fue usado una columna C₁₈ 250 mm x 46 mm, 5 μm (Supercosil, Sigma-Aldrich, USA), con condiciones: gradiente de 5 – 95% en 30 min, flujo de 1 mL min⁻¹, con una mezcla de solventes A=0.05% ácido fórmico en agua, y solvente B=0.05% ácido fórmico/MeCN, con detección en las longitudes de onda de 254 y 370 nm. Los solventes fueron previamente tratados sobre agitación en un baño de ultrasonido por 15 min a temperatura ambiente para eliminar el aire disuelto.

3.2.7. Cromatografía de alta eficiencia acoplada a espectroscopia de masas

100 μmol L⁻¹ (A = 0.5 – 0.6) de solución de betalaínas (250 μL) fue preparado para los ensayos de HPLC – MS/MS. Entonces, un equipo de HPLC – UV/Vis – MS (ESI+) con detector Bruker Maxis 3G Q-TOF equipado con una fuente de *electrospray* acoplado a un HPLC Shimadzu Prominence fue utilizado para el análisis a 25 °C. Para el análisis fue necesario el equipamiento de una columna C18 (250 x 46 mm, Supelco – Sigma Aldrich) y un detector PDA SPD-M20A. Fue utilizado N₂ como nebulizador a 27.6 psi y gas secante (9 L min⁻¹, 300 °C). Las condiciones de análisis fueron aplicando un gradiente lineal de 5 – 95 % en 30 min, siendo el solvente A: 0.05% ácido fórmico en agua, y B: 0.05% ácido fórmico en MeCN.

3.2.8. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H)

1 mg de betalaína fue disuelto en 500 μL de D_2O , y adicionados en tubos de 5 mm de RMN (500 MHz). Enseguida fue obtenido los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno en un espectrómetro Bruker Avance III 500, operado a 500.13 MHz a 25 $^\circ\text{C}$.

3.2.9. Cinética de descomposición de las betalaínas

La cinética de descomposición en solución acuosa (tampón Fosfato o Tris) fue acompañado con el auxilio de un espectrofotómetro UV-1800 con adquisición del espectro de absorción en la faja de 300 – 750 nm, en un ayuda de un baño a temperatura controlada (25, 40 o 85 $^\circ\text{C}$) (Huber Minichiller, Modelo HUB 16009, UK). Los experimentos fueron realizados por triplicada, y el decaimiento fue realizado durante dos vidas medias, con adquisición espectral a cada 5 min o 15 min. Las mediciones fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 500 μL , de camino óptico 10 mm, con un volumen de 450 μL .

3.2.10. Obtención de las constante cinéticas observadas (k_{obs})

Los valores de las constantes fueron calculadas, a partir de los datos de la variación de absorción en diferentes longitudes de onda en función del tiempo⁸⁸. Las curvas obtenidas fueron ajustadas con ayuda del programa OriginPro 2019 (OriginLab, 2019), siguiendo un modelo cinético de primer orden, mediante el uso de una función monoexponencial o biexponencial, según:

$$\begin{aligned} Abs &= Abs_0 + Abs_1 e^{-K_{\text{obs}}t} \\ Abs &= Abs_0 + Abs_1 e^{-K_{\text{obs}1}t} + Abs_1 e^{-K_{\text{obs}2}t} \end{aligned}$$

3.2.11. Capacidad antiradicalar

El ensayo de capacidad antioxidante en equivalente a Trolox (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) fue utilizado para determinar la capacidad antirradicalar de las betalaínas. ABTS (ácido 2,2'-zinobis- (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico), 7 mmol L^{-1}) fue

parcialmente oxidado por persulfato de potasio (2.45 mmol L^{-1}) produciendo solución de $\text{ABTS}^{+\bullet}/\text{ABTS}$ en agua. La reacción se llevó a cabo en la oscuridad a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 h. La solución stock de $\text{ABTS}^{+\bullet}/\text{ABTS}$ se diluyó a una absorbancia de 0.7 ($46.7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{ABTS}^{+\bullet}$) a 734 nm usando el tampón de fosfato (0.4 mol L^{-1} , pH 7.4). Después de la adición de antioxidante ($20\text{-}60 \text{ } \mu\text{L}$, concentración final dentro del rango $\mu\text{mol L}^{-1}$), los cambios en la absorbancia a 734 nm se monitorearon durante un período de 6 min (ΔA). La capacidad antioxidante es proporcional a la pendiente de la correlación lineal entre ΔA y la concentración de antioxidantes. El TEAC es la relación de pendientes $m_{\text{muestra}}/m_{\text{Trolox}}$.¹¹⁶

3.3. Ensayos Biológicos

3.3.1. Ensayo con células inmortalizadas HeLa y HepG2

La viabilidad celular fue ensayada vía MTS/PES ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna]/[fenazina etosulfato]).

Se preparó las soluciones de lauril sulfato de sodio (LSS) en agua MiliQ ($0 - 3.3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Las soluciones de Tris y betalaínas ($0 - 8.2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) fueron preparados con agua MiliQ. El MTS ($\lambda_{\text{máx}} = 490 \text{ nm}$) fue adquirido comercialmente (G3580, CellTiter 96®AQ_{ueous}, Promega, WI, USA), y fue usado por pocillo $20 \text{ } \mu\text{L}$. Todas las muestras fueron filtradas por membrana $0.22 \text{ } \mu\text{m}$. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.3.1.1. Cultura celular

Las células HeLa y HepG2 fueron cultivadas en 75 cm^2 de frascos de cultura celular de plástico de 200 mL con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibióticos. Ambas líneas celulares fueron incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y en un incubador humidificado con una atmosfera de CO_2 al 5%. Los pasos de cultura celular se realizaron mediante tripsinización cuando la confluencia alcanzó el 90% según protocolos estudiados¹¹⁷. El medio fue eliminado y las células confluentes que formaron una monocapa se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, pH 7.4. Las células fueron incubadas con 1 mL de tripsina 0.25% por 3 minutos. Las células fueron resuspendidas por pipeteo, se transfirieron

en tubos de 15 mL y centrifugados a 300 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en DMEM 10% FBS. Ambos fueron subcultivados tres veces por semana para evitar la sobrepoblación y la muerte celular¹¹⁸. La concentración de células en suspensión fue determinada empleándose una cámara de Neubauer. Esta cámara posee cuadrantes de dimensión definida que permite el conteo de células por microscopia óptica. Una alícuota de células en suspensión fue adicionada entre las rejillas de conteo de la cámara y su lámina de forma a llenar todo el volumen disponible. El conteo es calculado según: $C=10^4 \times N_C/N_Q$, donde C es la concentración de células en cultura por mL de medio, N_C es el número de células contadas y N_Q es el número de cuadrantes.

3.3.1.2. Ensayos de viabilidad celular (MTS)

Ambos modelos celulares fueron tripsinizados y transferidos (3×10^5 células por pozo) para una placa de 96 pozos e incubadas por 24 h en 10% FBS suplementado con DMEM hasta la completa adherencia y confluencia. El medio fue removido (por aspiración) y las células fueron lavadas (X2) con 100 μ L de PBS (enriquecido con Ca^{2+}/Mg^{2+} , pH 7.4)¹¹⁸. En seguida, fue adicionado 100 μ L de medio DMEM incoloro a cada pozo con células, y sin células para el blanco. La placa fue incubada hasta la preparación y adición de los compuestos. En seguida las células, en cada pocillo por separado, fueron tratadas con 5 μ L de las soluciones de LSS (control positivo), agua (DMEM 10% FBS), Tris y betalaínas sobre 100 μ L de medio DMEM 10% FBS. Después, la placa de 96 pozos fue incubada por 24 h a 37 °C en un incubador humidificado con una atmosfera de CO₂ al 5%. Luego, fue adicionado 20 μ L de CellTiter 96®AQueous[†] e incubado por más 4 h por 24 h a 37 °C en un incubador humidificado con una atmosfera de CO₂ al 5%. Se retiró la placa e inmediatamente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro en un lector de microplacas SpectraMax M4 Microplate Reader en 490 nm^{118,119}. La viabilidad fue calculada mediante el cociente del promedio de la absorbancia de la muestra y el promedio de la absorbancia del control, todo multiplicado por 100. Fue definido como 100% de viabilidad celular, las que no fueron encubados con los compuestos¹²⁰.

[†] Un nuevo compuesto de tetrazolio [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (fenazina etosulfato; PES).

3.3.1.3. Área de colecta de animales

La Estación Ecología de Juréia–Itatins localizado en el litoral sur de Sao Paulo, Brasil (24°26'7.43''S–47°7'46.12''W), posee un área de aproximadamente 80 ha, y sus tierras cubren los distritos de Itariri, Miracatu, Pedro de Toledo, Iguape y Perú. Esta estación ecológica es una reserva importante de biodiversidad del Bosque Atlántico¹²¹, aun preservado y se considera una unidad de conservación. Las unidades de conservación han sido la mejor manera de proteger la biodiversidad porque, con el aumento del crecimiento de la población y la reducción de los hábitats naturales, son uno de los pocos sitios naturales para la mayoría de la presencia humana intolerante a la biota¹²¹. La unidad de conservación de la Estación Ecología de Juréia – Itatins fue creado el 2006. Al mismo tiempo, la Estación Ecología de Juréia – Itatins se transformó en un área de protección ambiental^{121,122}.

3.3.1.4. Animales

El cangrejo *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda: Portunidae)¹²³, Siri Azul (Siri de Rio, Siri de Punta), fue capturado el 27 de febrero del 2018, utilizando redes de pesca y transportado en un recipiente de plástico 30 × 30 × 100 cm durante 3 h a 22 ± 1 °C, en la oscuridad. Todos los animales (9.0 ± 0.3 cm, 63 ± 7 g, n = 5) estaban en la etapa de intermuda, con el tamaño permitido para colecta, según legislación brasileña, mayor a 7 cm (ancho de caparazón > 7 cm)^{124,125}. Estos fueron llevados para el laboratorio de Fisiología de la Universidad de Sao Paulo, donde fueron aclimatados por 7 días en el vivero. Los cangrejos fueron mantenidos en tanques lleno de agua de mar (salinidad 30 ppt), con divisores de plástico de PVC (fracciones de tubos de diámetro de 15 cm, y 10 cm de alto), el nivel de agua estaba con 5 cm sobre el animal para evitar sobreexposición al aire. Estos fueron mantenidos también, en fotoperíodos de 12:12 h claro:oscuro, a temperaturas de 22 ± 3 °C. Apenas los cangrejos en etapa de intermuda fueron usados para evitar influencias metabólicas. Estos cangrejos mantenidos en laboratorio, luego del periodo de aclimatación, fueron anestesiados por criogenia y colectadas las muestras de pedúnculo ocular (ojos del cangrejo), ya que esta parte del cangrejo no posee tantos interferentes como los órganos internos. Finalmente, las muestras fueron colocadas en tubos de Eppendorf (1.5 mL) y congeladas, y transportadas hasta el análisis a – 80 °C.¹²²

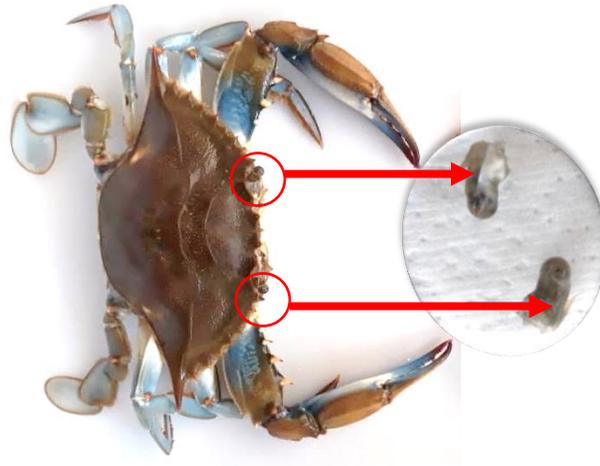


Figura 3.1. Colecta de los pedúnculos oculares del cangrejo azul (*Callinectes danae*).

3.3.1.5. Extracción del tejido del pedúnculo ocular

Con un bisturí o tijera metálica, esterilizada y libre de contaminación biológica, se cortó los pedúnculos oculares (**Figura 3.1**). Luego, con el uso de tijeras de microdissección comercial y ayuda de una lupa (**Figura 3.2**), se hizo una hendidura en el pedúnculo ocular y se extrajo la parte interior, descartando el cristalino (este contamina la muestra).



Figura 3.2. Utensilios para el corte del pedúnculo ocular y extracción del material biológico de interés.

El pedúnculo ocular cortado fue colocado sobre una Placa de Petri, pretratado con DEPC (Pirocarbonato de dietilo) y autoclavado, que contenía tampón salino pH 7.4 (NaCl: 29 g, CaCl₂: 1.44, MgSO₄: 6.32 g, KCl: 0.7 g, HEPES: 10 mmol L⁻¹, 1.2 L), a 4 °C. El pedúnculo ocular fue abierto suavemente en la mitad con la ayuda de dos pinzas. Luego se extrajo los ganglios sujetando el nervio óptico. Se retiró la retina y la vaina neural, evitando la medula terminal que se muestra encerrado en el círculo rojo (**Figura 3.3**, la pequeña mancha blanca es la glándula sinusal).



Figura 3.3. extracción de los ganglios, a través del pedúnculo ocular.

Finalmente, se colectó la glándula sinusal con pinzas, retirando cuidadosamente el agua entre las pinzas, y se colocó en un eppendorf de 1.0 mL en hielo seco inmediatamente.

3.3.1.6. Extracción del ARN del pedúnculo ocular

La extracción de ARN fue siguiente una serie de pasos en un estricto orden:

a. Homogenizado

- 100 mg de pedúnculo ocular fueron colocados en un Eppendorf de 1.5 mL, y se adicionó 300 µL de QIAzol lysis reagent (**Qiagen, Santa Ana, CA, USA**). El tejido fue entonces homogenizado mecánicamente con un pistilo plástico, hasta ser destruido completamente. Entonces, fue adicionado más 700 µL ($V_f = 1$ mL).
- La centrifuga, en este paso fue enfriado a 4 °C.
- El tejido homogenizado fue almacenado a 0 °C, en hielo, por 5 min.

- Se adicionó 200 μ L de cloroformo, y agitó los tubos en vórtex.
- Se incubó en hielo por 2 -3 min para separar 2 fases (fase rosada: Qiazol, proteínas, grasas; y fase transparente: ARN).
- Se centrifugó a 12 000 \times g por 15 min.

b. Precipitación

- Se transfirió 0.4 mL de la fase transparente, para nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL (se evitó tocar la interfase).
- Se adicionó 0.4 mL de isopropanol, y se incubó en hielo por 5 min.
- Se centrifugó a 12 000 \times g por 10 min a 4 °C, y se formó un pellet.

c. Lavado

- Se removió el sobrenadante (lo máximo que se pudo, sin tocar el pellet formado), y se adicionó 0.8 mL de etanol 70 – 75%.
- Se agitó con ayuda de un vórtex y se centrifugó por 5 min a 7500 \times g a 4 °C.
- El lavado se realizó dos veces.
- Se removió el etanol, la máxima cantidad sin tocar el pellet.
- Con ayuda de un Spin se retiró la máxima cantidad de agua, para obtener el pellet lo más seco posible.
- El pellet se dejó secar, manteniendo el tubo Eppendorf abierto por 5 min.
- Se resuspende el ARN en agua tratada con DEPC (11 μ L) y se cuantificó la cantidad de ARN con ayuda de un **NanoDrop** Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Se selecciona RNA measure, se usa un blanco con agua para calibrar el equipo; luego insertar 1 μ L de la muestra para cuantificar).
- El resultado fue dado en μ g/mL (1.5 – 2.0).

3.3.1.7. Formación de ADNc a partir del ARN del pedúnculo ocular

La formación de ADN complementario (ADNc), en este paso, fue necesario para obtener muestras más específicas que el ADN inicial. Para la formación de ADNc fue necesario el uso de un Kit (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser) en dos pasos:

i) Paso 1 (condición de termociclador 42 °C, 2 min)

Reactivos:

- 5X gDNA Eraser Buffer (2 µL).
- gDNA Eraser (1 µL).
- ARN extraído del pedúnculo ocular (1.5 µg), medido con nanodrop
- RNase free H₂O (7 µL)

ii) Paso 2 (condición de termociclador 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s)

- Solución del paso 1 (10 µL)
- 5X PrimeScript Buffer 2 (for all real time) (4 µL)*
- PrimeScript RT Enzyme mix I (1 µL)*
- RT Primer Mix (1 µL)*
- RNase free H₂O (4 µL)*

*Master Mix (V = 10 µL)

Luego de esta preparación fue almacenado a 4 °C.

El ADNc obtenido fue diluido para 12.5 ng/ µL, considerando la cantidad de ARN inicial 1.5 µg del paso 1, adicionando **100 µL** de agua molecular al final del paso 2.

3.3.1.8. Ensayos de PCR

Inicialmente, se adicionó 1 µL de ADNc a un Eppendorf de 200 µL, 0.5 µL primer específico AKR (5' – ACG CGC TTC TCA ATC TCG TTA – 3'), 0.5 µL primer específico AKF

(5' – CTA CCA CAA CGA CAA CAA GAC CTT C – 3'), y 10 μ L de GoTaq® Green Master Mix. Toda la preparación se realizó en hielo ($T < 2$ °C). En seguida, se coloca el Eppendorf en el termociclador **Bio-Rad PTC-200 Peltier thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)** con las siguientes condiciones de trabajo: 94 °C por 2 min 30 s (desnaturalización inicial), 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y 94 °C por 30s, y una desnaturalización final a 94 °C por 7 min (**Figura 3.4**).

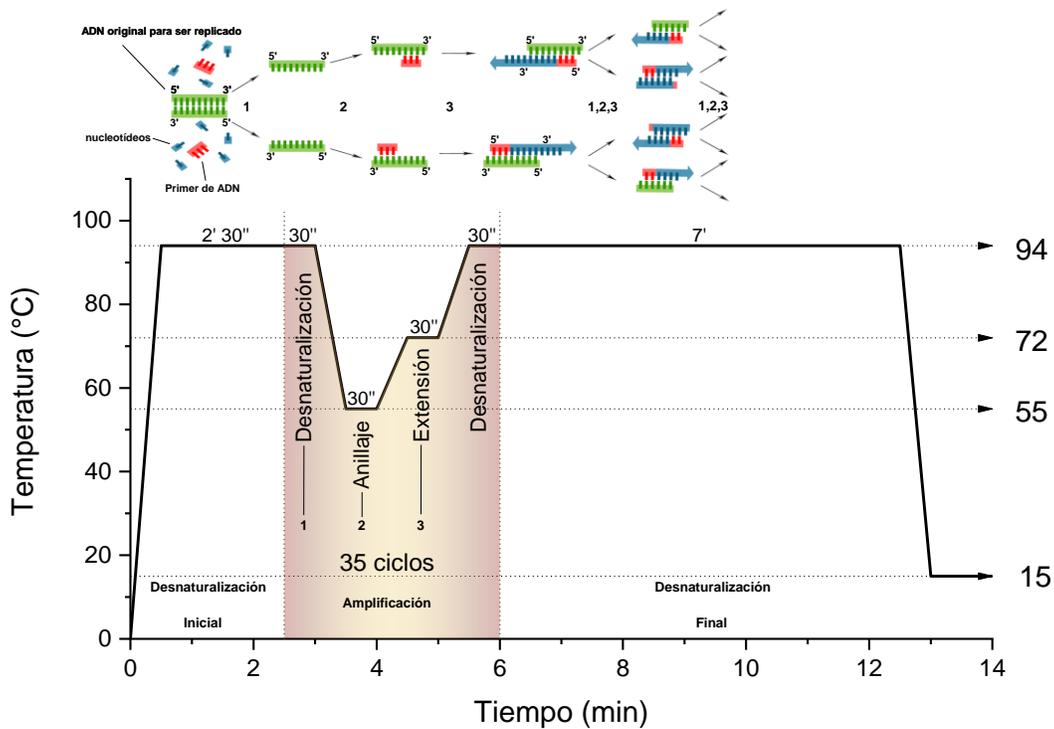


Figura 3.4. Condiciones para PCR del ADNc.

3.3.1.9. Preparación de Gel de Agarosa y obtención de ADNc específico

Para la preparación del gel de agarosa (**Figura 3.5 – 3.6**) fue necesario las siguientes soluciones:

- Solución de agarosa 1.5% en TAE 50 mmol L⁻¹ (1X)

La solución TAE fue preparada en Stock de 500 mmol L^{-1} (10X): 60.57 g Tris base, 14.3 mL ácido acético glacial, y 25 mL de 100 mmol L^{-1} de EDTA (pH 8), ajustado para 1.0 L, llevado a un pH final de 8.3, y filtrado con un microfiltro de $0.22 \mu\text{m}$ para evitar el precipitado.

-1X TAE (mismo tampón que en agarosa)

- 6X tinte de carga de ADN (Ladder).

-10 mg/mL de bromuro de etidio o propidio.

- a. Se preparó una solución de 100 mL de agarosa al 1.5%, para lo cual utilizó 1.5 g de agarosa en un vaso de precipitado de vidrio, y se adicionó 100 mL de tampón 1X. Con ayuda de un horno de microondas (2 min, P 10, $T_{\text{aprox}} \sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$) se calentó hasta que la agarosa se disuelva hasta llegar a una solución clara, evitando la ebullición violenta.
- b. Se esperó hasta que la solución se enfríe hasta aproximadamente $55 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de verter. El bromuro de etidio se adicionó en este punto a una concentración de $0.5 \mu\text{g/mL}$ ($2 \mu\text{g}$ de la solución stock).
- c. Se preparó la placa de gel en una bandeja de acrílico hecha a medida (10 cm x 10 cm x 1 cm). Entonces, se colocó el peine en la bandeja de gel a aproximadamente 2.54 cm de un extremo de la bandeja, y se colocó el peine verticalmente de modo que los dientes estén aproximadamente a 1 – 2 mm por encima de la superficie de la bandeja.
- d. Se vertió la solución de gel de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ en la bandeja a una profundidad de aproximadamente 5 mm. Se esperó hasta que el gel se solidifique unos 20 minutos a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura de trabajo).
- e. Para correr, se retiró suavemente el peine, se colocó la bandeja en la cámara de electroforesis y cubra (solo hasta que los pozos estén sumergidos) con tampón de electroforesis (el mismo tampón utilizado para preparar la agarosa). El exceso de agarosa se almacenó a temperatura ambiente para volver a fundir en un microondas.
- f. Se preparó las muestras para electroforesis, y se agregó al primer pocillo **6 μL** de tinte de carga de gel 6X (Ladder). En los otros pocillos se adicionó **6 μL** de las muestras de ADNc. La Electroforesis fue realizado con 100 voltios hasta que los marcadores de tinte hayan migrado una distancia apropiada, después de 1 h.

- g. Finalmente, se recogió el gel cuidadosamente, y se visualizó el gel bajo la luz ultravioleta usando un sistema trasluminador (Clever Scientific Ltd., UK), y se colectó la fracción de ADN retenida en 300 kb cortando una fracción de gel para luego purificar (**Figura 3.7**)[∅].

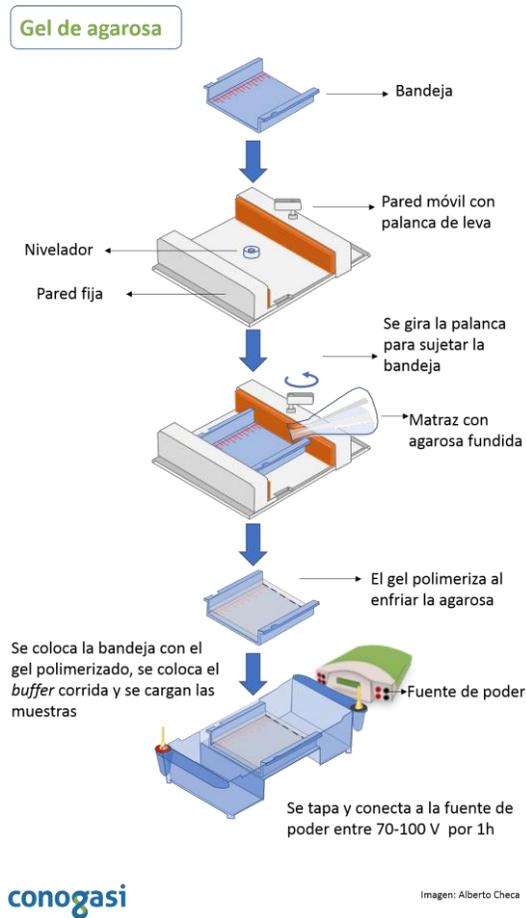


Figura 3.5. Sistema ilustrativo para la preparación del Gel de Agarosa. (Checa Rojas, A.; 2017)¹²⁶

[∅] Este experimento fue alternativo, ya que se realizó un secuenciamiento en las mezclas betalaínas – ADNc.

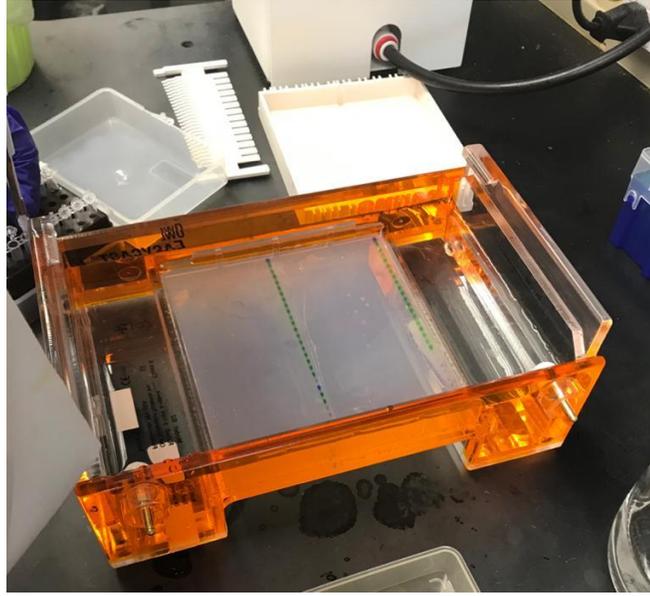


Figura 3.6. Sistema para electroforesis en gel. Condiciones externas de 22 °C.

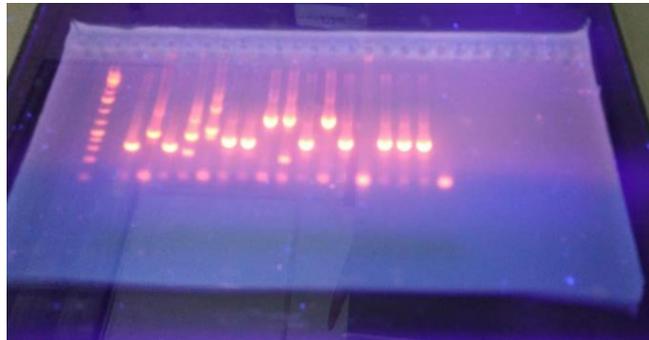


Figura 3.7. Transiluminación (312 nm) del gel de agarosa después de 1 h de proceso de electroforesis. Muestras de ADNc.

3.3.1.10. Ensayos con betanina pre- y pos-PCR

Para estudiar la interferencia de las betalaínas en los ensayos de PCR, fue necesario realizar dos experimentos.

- a. **Betalaínas antes del ensayo de PCR** – Se adicionó 1 μL de ADNc a un Eppendorf de 200 μL , 0.5 μL primer específico (Arginine Kinase, forward primer) AKF (5' – CTA CCA CAA CGA CAA CAA GAC CTT C – 3'), 0.5 μL primer específico (Arginine Kinase, reverse primer) AKR (5' – ACG CGC TTC TCA ATC TCG TTA – 3'), 1 μL de betalaínas (0, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) y 10 μL de GoTaq® Green Master Mix, tampón

de reacción, pH 8.5 (Promega Corp., Madison, WI, USA). Toda la preparación se realizó en hielo ($T < 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). En seguida, se siguió el procedimiento de PCR, y posterior ensayo en gel de agarosa (electroforesis).

- b. Betaínas después del ensayo de PCR** – Se adicionó 1 μL de ADNc a un Eppendorf de 200 μL , 0.5 μL primer específico AKR (5' – ACG CGC TTC TCA ATC TCG TTA – 3'), 0.5 μL primer específico AKF (5' – CTA CCA CAA CGA CAA CAA GAC CTT C – 3'), y 10 μL de GoTaq® Green Master Mix. Toda la preparación se realizó en hielo ($T < 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). En seguida, se siguió el procedimiento de PCR. Luego, 6 μL de ADNc resultante fue adicionado a 1 μL de betaínas (1 μL de betaínas (0, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para el posterior ensayo en gel de agarosa (electroforesis)

3.3.1.11. Ensayos de secuenciamiento

Fueron realizados ensayos de secuenciamiento de ADNc, para verificar la secuencia de las bases que la componen.

Entonces, 6 μL de ADNc obtenido del ensayo PCR, fue adicionado 4 μL de agua molecular, 1 μL de **ExoSAP-IT** (78201, USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), y llevado al termociclador con condiciones de 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min, y 80 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min (1 ciclo). En seguida, se toma una alícuota de 2.5 μL del resultante, y se adiciona 1 μL de primer específico AKR (3.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) y 4 μL de agua molecular. Finalmente, se llevó a **secuenciamiento** para su análisis en un Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer (Life technologies, Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Para verificar interferencias en el experimento de secuenciamiento con las betaínas, se realizó este mismo procedimiento descrito para los productos obtenidos en los ensayos de PCR (**3.3.1.10. a y b**).

3.4. Análisis de los resultados

Los gráficos y tratamientos matemáticos fueron realizados, a través del programa OriginPro 2019 (OriginLab, OriginLab, Northampton, MA). Los tratamientos estadísticos fueron

realizados utilizando el programa SigmaStat 3.1 (Sigma Stat, Ashburn, VA). Los esquemas fueron realizados con Adobe Photoshop Elements 11 (Adobe, USA).

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados serán presentados en la siguiente secuencia: extracción, purificación y caracterización de la betanina, obtención del ácido betalámico a partir de la betanina, hidrólisis de la betanina por tratamiento térmico, hidrólisis de la betanina en tampón biológico de amina primaria, identificación de una betalaína interferente, hidrólisis de la betalaína interferente, ensayos de actividad antiradicalar/antioxidante de las betalaínas, ensayo de proliferación celular con bajas concentraciones de betalaínas, ensayos de interferencia en electroforesis en gel, PCR y secuenciamiento originados por las betalaínas.

4.1. Obtención de la betanina

Inicialmente el jugo de betarraga fue filtrado sobre un paño común de café, y se obtuvo su espectro de absorción (**Figura 4.1**). El espectro de absorción fue deconvolucionado en dos bandas: una gaussiana con un máximo de absorción en 536 nm, que corresponde a la mezcla de betanina e iso-betanina ($\lambda^{\max}=536$ nm, $\epsilon_{535}=6.5 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹)^{88,115}, y otra banda con máximo de absorción en 478 nm correspondiente a las betaxantinas ($\lambda^{\max}=478$ nm, $\epsilon_{480}=4.8 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹)^{99,127}. Otros compuestos presentes en la muestra corresponden a los que absorben en el UV ($\lambda^{\max}<300$ nm) y en torno de 600nm¹¹⁵. El espectro de absorción deconvolucionado mostró un óptimo coeficiente de determinación (Adj-R²=0.9974). Este análisis del espectro muestra que la muestra de jugo de beterraga, posee una mayor cantidad relativa de betalaínas, es decir betalaína/betaxantina= 2.9. Las fracciones encontradas en el espectro total serían: vulgaxantina I ($\lambda^{\max}=470$ nm), prebetanina ($\lambda^{\max}=534$ nm), isoprebetanina ($\lambda^{\max}=534$ nm), betanina ($\lambda^{\max}=534$ nm), isobetanina ($\lambda^{\max}=536$ nm), 17-dCO₂-betanina ($\lambda^{\max}=500$ nm), 15-dCO₂-betanina ($\lambda^{\max}=522$ nm), 17-dCO₂-isobetanina ($\lambda^{\max}=500$ nm), neobetanina ($\lambda^{\max}=474$ nm), 2-dCO₂-(iso)betanina, betanidina ($\lambda^{\max}=538$ nm), y 2-dCO₂-neobetanina ($\lambda^{\max}=474$ nm)^{88,115}.

La amplia literatura científica^{8,9,30,115} ha demostrado luego de aplicaciones de técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, que la betanina/isobetanina puede ser cuantificado por técnicas espectrofotométricas ($\lambda^{\max}=536$ nm, $\epsilon_{535}=6.5 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹)^{88,115} desde que sean usados fuentes de betalaínas que no presenten grandes cantidades de betaxantinas, como el jugo

de tuna *Opuntia ficus-indica*^{20,27,38} o *Ullucus tuberosus*¹⁹. En ese sentido, este método es recomendable para muestras de betarraga *Beta vulgaris*²².

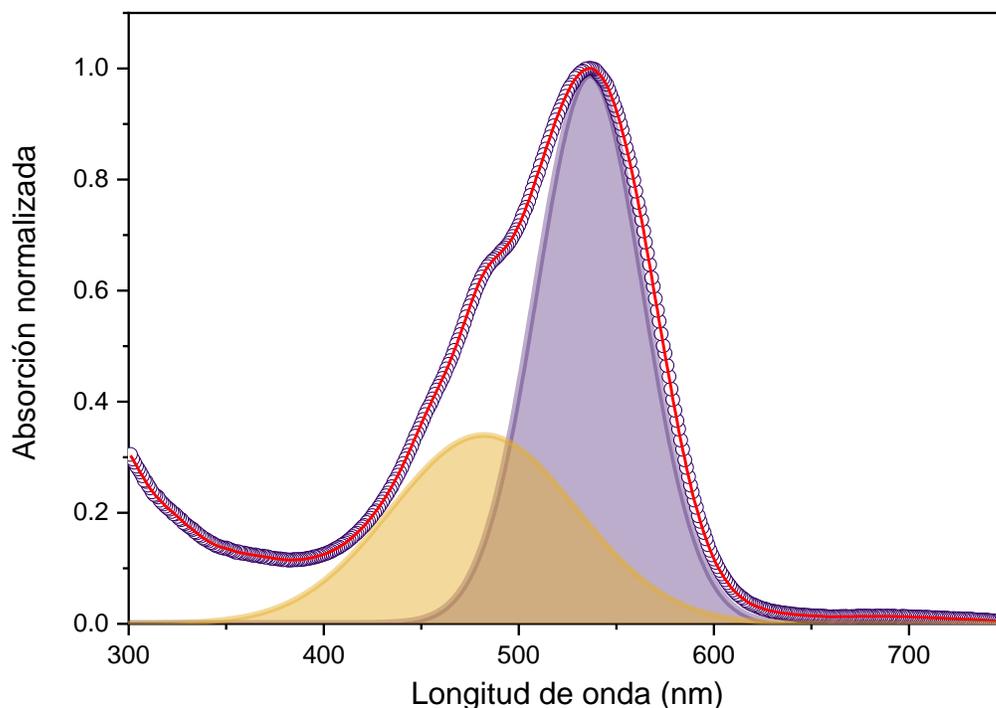


Figura 4.1. Espectro de absorción normalizado del jugo de betarraga filtrado. Las bandas deconvolucionadas corresponderían a las betaninas (morado) y betaxantinas (amarillo). La línea gruesa corresponde a los datos experimentales, y la línea roja a la banda ajustada, $\text{Adj-R}^2=0.9974$.

4.2. Purificación de la betanina

La betanina fue purificada utilizando cromatografía de adsorción en columna de sílicagel C18, ya que este método ha demostrado buen rendimiento en la purificación de betanina extraída de la betarraga >99%¹¹⁵. Las fracciones colectadas de color magenta, cerca de 1 mL, fueron analizadas por HPLC analítico, estas luego se juntaron después de presentar el mismo perfil cromatográfico. Las muestras en ningún momento fueron manipuladas usando antioxidantes o quelantes (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido cítrico o EDTA)^{41,99,128}. Los análisis de HPLC de las muestras de betanina purificada fueron realizados sobre soluciones acuosas con intensidad de absorción de luz en 536 nm entre 0.3 – 0.5. Esto con la finalidad de reducir las discrepancias de determinación de la concentración de la betanina realizados métodos cuantitativos espectrofotométricos e cromatográficos¹²⁹.

El espectro de absorción de la betanina purificada ($\lambda^{\max}=536$ nm)^{88,115} se muestra en la **Figura 4.2**. Se observa que a diferencia del espectro de absorción del jugo de betarraga (**Figura 3.1**), el espectro después de la purificación por sílicagel C18, no muestra más el hombro en 480 nm (**Figura 4.2**). Esta observación es confirmada por el análisis cromatográfico (HPLC), que indica que la Bn fue obtenida con un excelente grado de pureza (>98%, 254 nm)[‡], similar a los obtenidos en la literatura^{88,115}. La betanina purificada fue analizada por cromatografía líquida acoplada con detectores de arreglo de diodos y espectrometría de masas en modo positivo de ionización *electrospray* HPLC-DAD-MS(ESI+)¹¹⁵ (**Figura 4.3, Esquema 4.1**). Se consiguió obtener 30 mg de betanina por cada 100 g de muestra bruta. Este rendimiento puede ser variable y va depender del tipo de columna cromatográfica a ser utilizada, y del tiempo de purificación que puede tomar entre 3 a 5 horas por columna¹¹⁵.

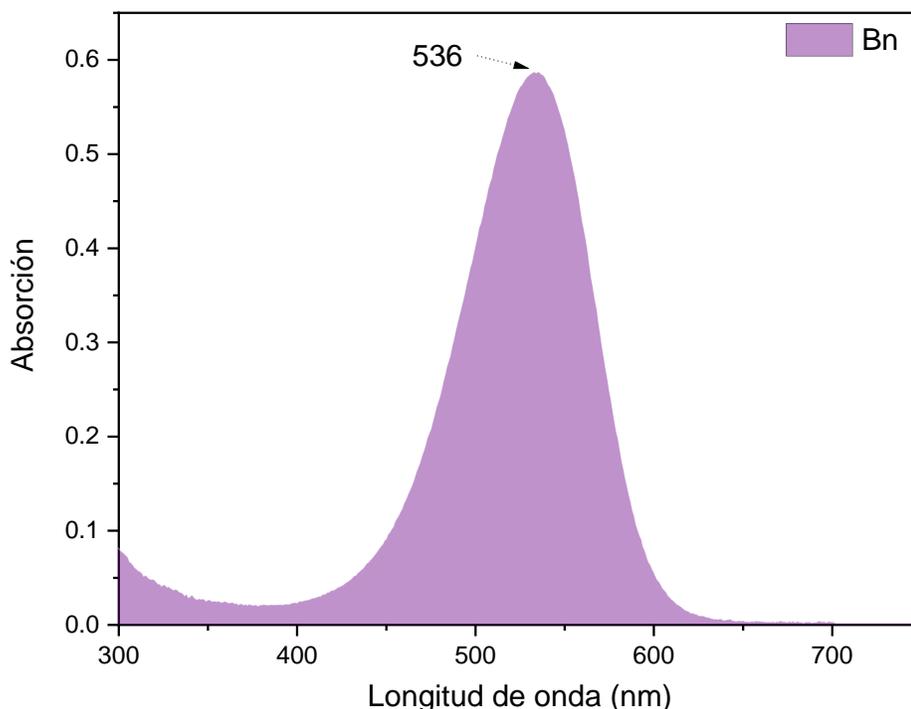


Figura 4.2. Espectro de absorción de la betanina. [Bn] = 8.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{Bn}^{abs} = 536$ nm en pH = 7.0, T = 25 °C, $\epsilon = 6.5 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹.

[‡]Este resultado fue comprobado usando padrones de betanina caracterizado por RMN, HPLC-DAD-MS(ESI+)¹¹⁵.

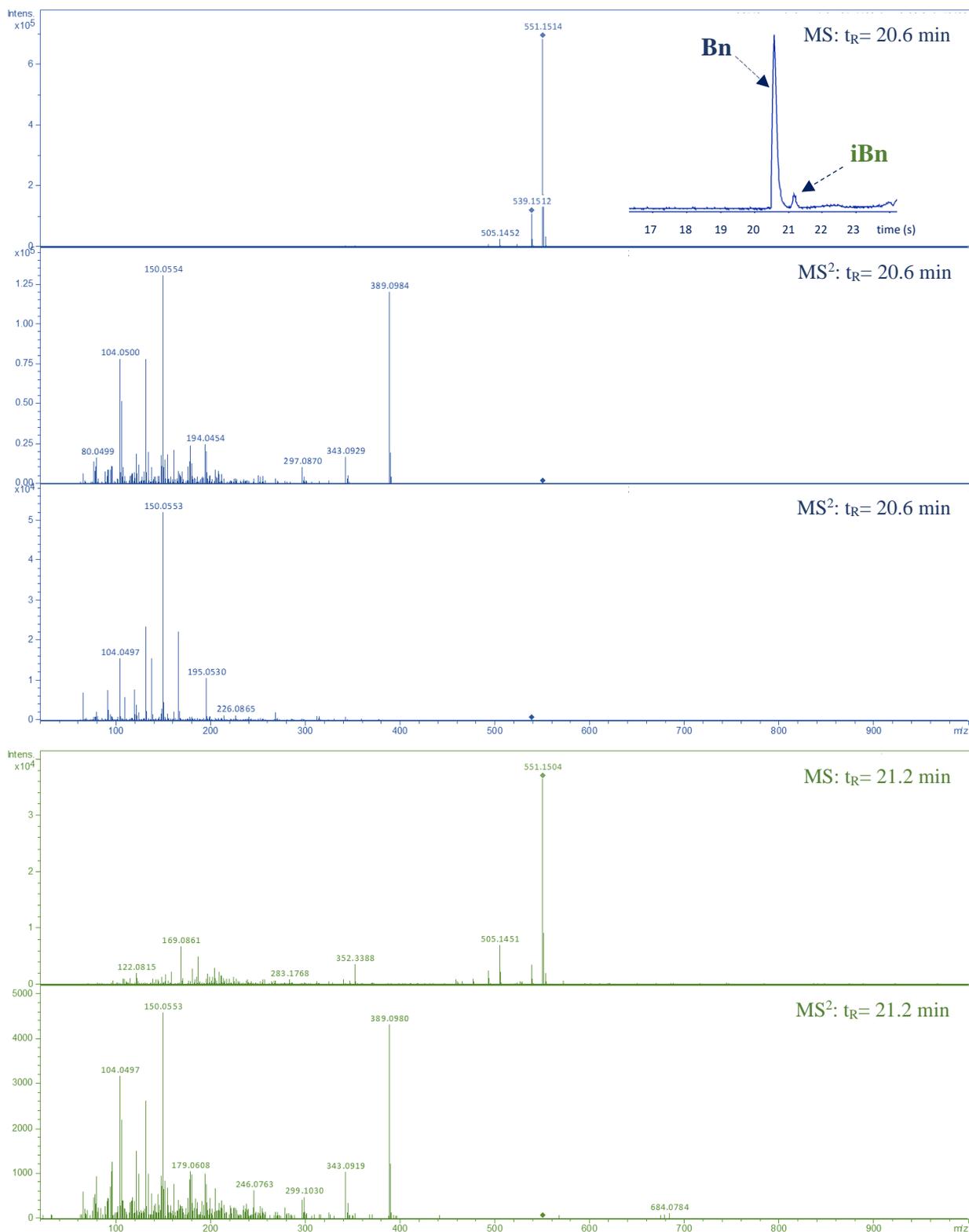
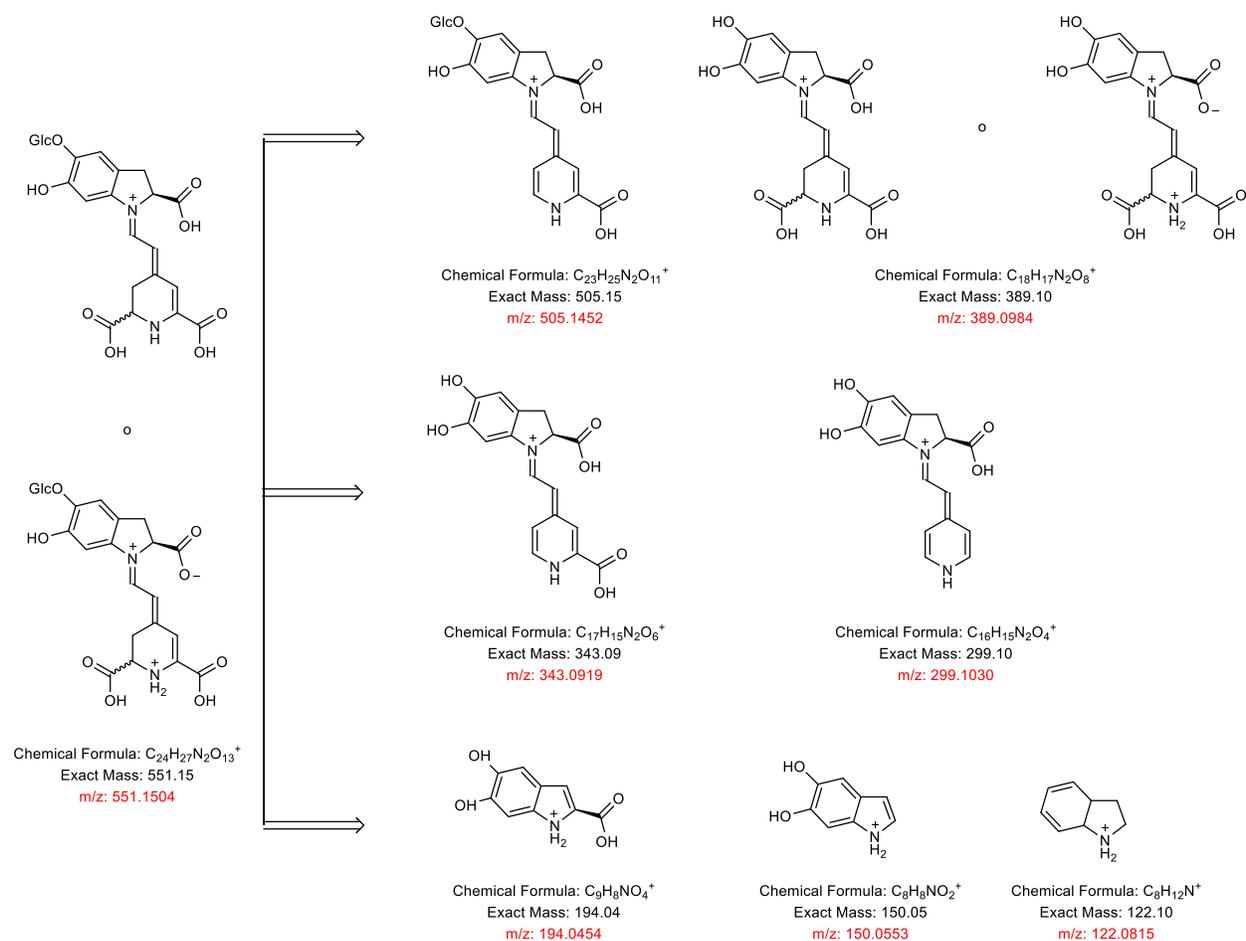


Figura 4.3. Cromatograma de la **Bn** e **iBn** acompañado por UV-vis en 254 nm (columna de fase reversa C18, 250 × 4.6 mm; sistema cromatográfico: 5 – 95% en 30 min, siendo el solvente A: 0.05% HCO₂H/agua y solvente B: 0.05% HCO₂H/MeCN), y espectrograma de HPLC-DAD-MS/MS(ESI+) de los picos en t_R = 20.6 min (**Bn**) y t_R = 21.2 min (**iBn**).



Esquema 4.1. Fragmentación propuesta para ESI(+) – MS de la betanina purificada. **Incertidumbre** = 1 m/z unidad. Ambas formas de protonación de la betanina se presentan en este esquema, ya que no podríamos distinguirlas inequívocamente.

El color y otras propiedades fotofísicas de la betanina se ven afectadas por varios factores externos^{92,130}. El jugo de betarraga se vuelve anaranjado-amarillo al calentarse, principalmente debido a la hidrólisis, descarboxilación y autooxidación de la betanina. A pesar de este inconveniente la betanina y otras betalainas muestran una amplia estabilidad al pH, que es una ventaja sobre las antocianinas²¹.

La mayor dificultad para una discusión de los resultados es la falta de datos precisos con respecto a los valores de pK_a de las betalainas. Este problema radica en los cuasi inexistentes reportes sobre esta información, y esto es debido a que las betalainas son normalmente obtenidas

en pocas cantidades, lo que dificulta hacer una titulación potenciométrica (exige concentraciones entorno de 10 mmol L^{-1} con volúmenes de 10 mL)¹³¹, y durante la titulación espectrofotométrica, existe sobreposición de bandas que hace de absorción de los ácidos y bases conjugadas lo que impide la localización de longitudes de onda para un correcto monitoreo¹³¹. En ese sentido los valores de pK_a reportados son limitados para la betanina pK_{a1} (C2-COOH) < 2, pK_{a2} (C15-COOH) = pK_{a3} (C17-COOH) ~ 3.4 , pK_{a4} (HO-DOPA) = 8.5 ^{88,132}. Entonces los pK_a s de la betanina fueron reportados entre 2.9 – 3.4 para las porciones carboxílicas, y 8.5 – 8.7 para el hidroxilo fenólico^{132–134}. Nuestros cálculos teóricos de los valores de pK_a (pK_a^T) para la betanina utilizando el método empírico implementado en MarvinSketch, predice que los grupos carboxílicos C2 ($pK_{a1}^T = 1.5$) es el más ácido, seguido de los grupos carboxílicos en C17 ($pK_{a2}^T = 3.1$) y C15 ($pK_{a3}^T = 3.8$), y en el grupo 5-OH ($pK_{a4}^T = 8.5$), que son similares con los valores encontrados en la literatura. Sin embargo, el N16 se estima un $pK_{a1}^T = 10.0$, que tendría sentido teniendo en cuenta un aminoácido (**Figura 4.4**). El punto isoeléctrico (punto de neutralidad de carga) de la betanina, también fue relatado en una faja de pH entre 1.5 – 2.0¹³² (**Figura 4.5**). Las macroespecies más importantes con su respectiva carga son descritas en la **Figura 4.6**.

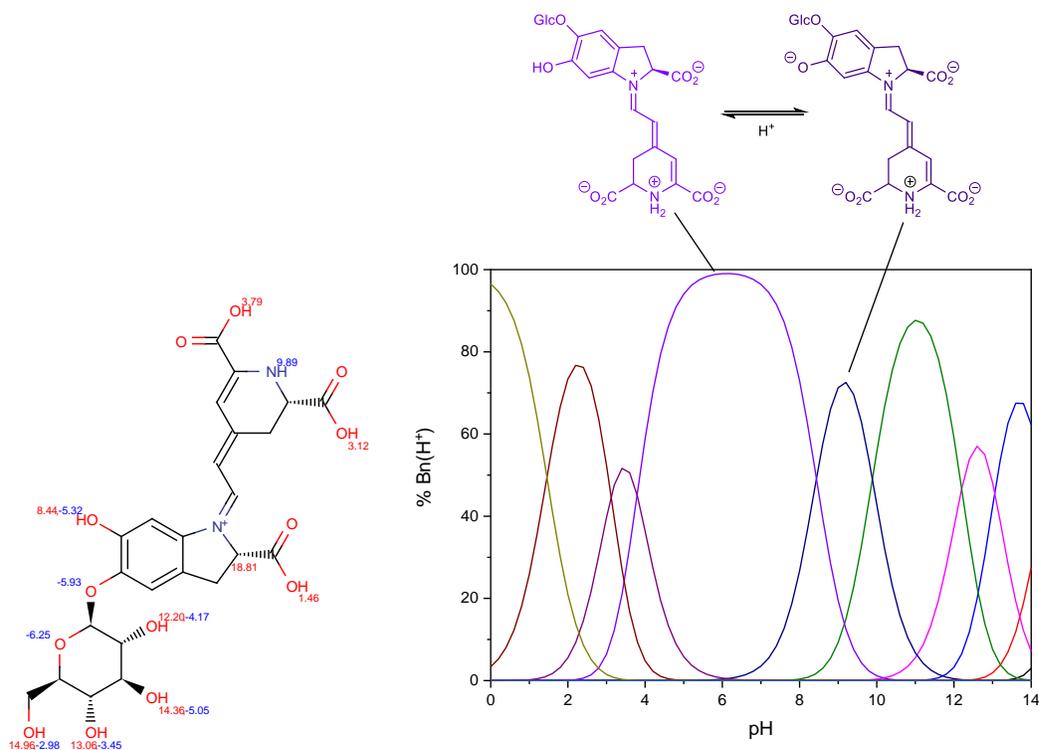


Figura 4.4. Macroespecies y constantes de disociación en función del pH calculado por el programa MarvinSketch V5.2.0. Los valores de pK_a y pK_{aH} están en rojo y azul, respectivamente. La distribución de las macroespecies no considera la hidrólisis de la betanina. (<http://www.chemaxon.com/marvin/help/calculations/pKa.html>).

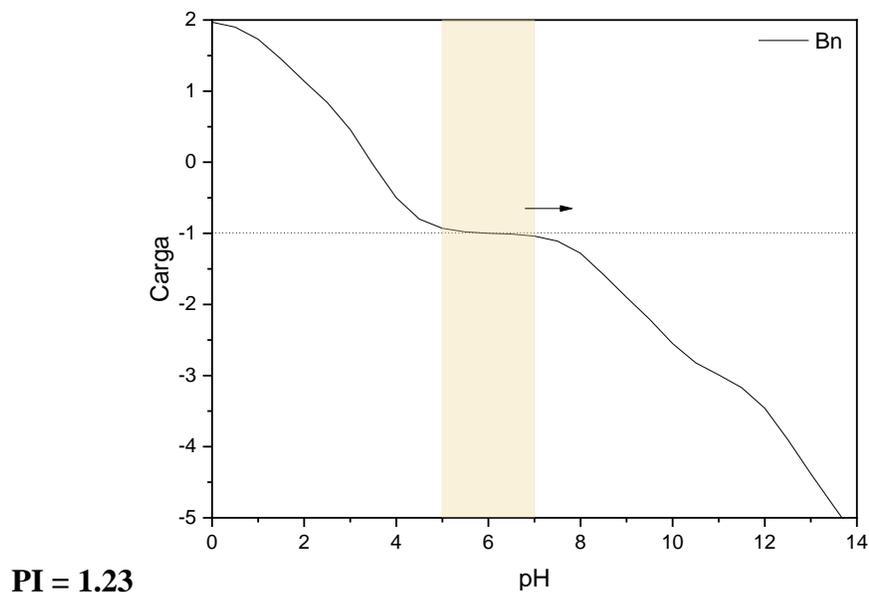


Figura 4.5. Distribución de carga media para la betanina en función del pH calculados por el programa MarvinSketch. (método utilizado: aditivo). (<http://www.chemaxon.com/marvin/help/calculations/pKa.html>).

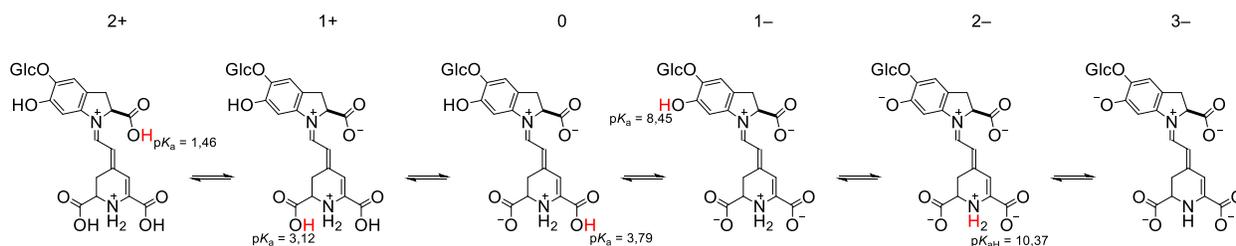


Figura 3.6. Estructuras de betanina en equilibrio ácido-base. Los valores en la parte superior, pertenecen a la carga total de la especie química. Los valores de pK_a y pK_{aH} fueron calculados por el programa MarvinSketch V5.2.0 usando el método aditivo.

4.3. Descomposición de la betanina

La betanina purificada en fase reversa, y analizada por cromatografía líquida de alta performance, fue sometida a 85 °C por 60 min a pH 8.5[§] en tampón fosfato (50 mmol L⁻¹). La betanina con concentración de 5.4 μmol L⁻¹ (calculado con $\lambda^{\max} = 536 \text{ nm}$, $\epsilon_{536} = 6.5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{88,115} fue monitoreada por espectrofotometría, y los espectros fueron obtenidos a cada 1 min (**Figura 4.7**). El análisis del perfil de absorción de la Bn indica un máximo de absorción en 540 nm con una disminución de banda en función al tiempo, y la aparición seguida de disminución de

[§]Se analizó en 85 °C, ya que los ensayos realizados en biología molecular exigen ciclos a estas temperaturas por varios minutos.

una banda en 422 nm que corresponde al máximo de absorción de HBt (**Figura S1**), que es uno de los productos de la hidrólisis de la Bn. Los datos para la degradación de Bn en estas condiciones ($\lambda^{\text{max}}=540$ nm) fueron ajustados utilizando una función monoexponencial, y de esa forma fue calculada la constante cinética observada (k_{obs}) fue calculada en $0.13 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, correspondiendo un tiempo de vida-media ($t_{1/2}$) de 5.0 ± 0.3 min. La formación y posterior descomposición del HBt fue ajustado utilizando una función biexponencial, obteniendo la constante cinética observada de formación (k_{obs1}) de $0.16 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y el tiempo de vida-media ($t_{1/2,1}$) de 5.0 ± 0.1 min, y una constante cinética de degradación (k_{obs2}) de $0.019 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, con un tiempo de vida media ($t_{1/2,2}$) de 42 ± 4 min.

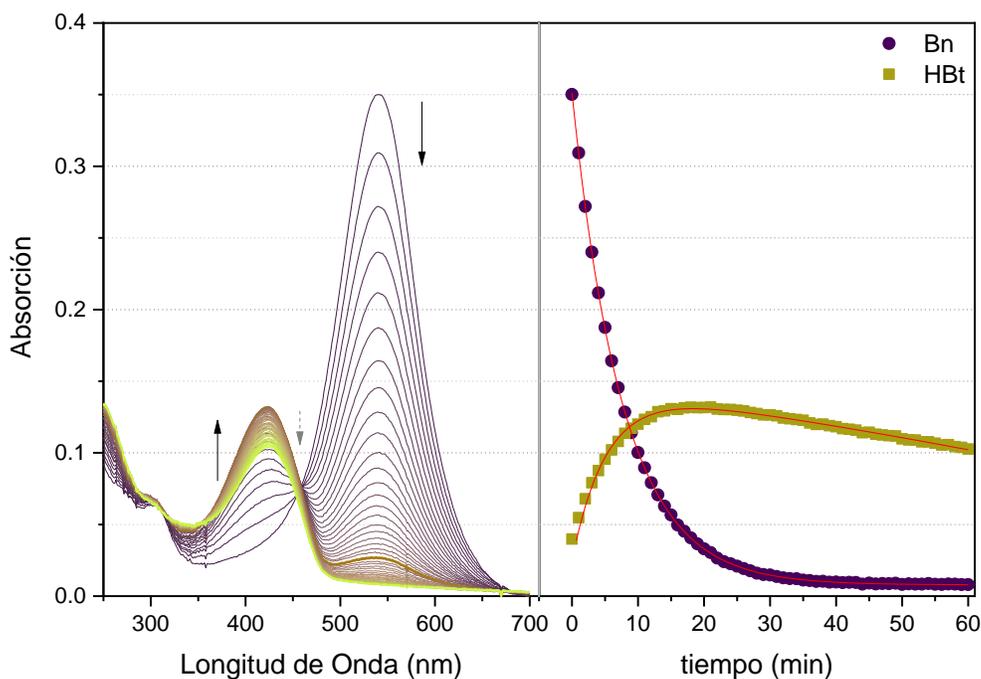


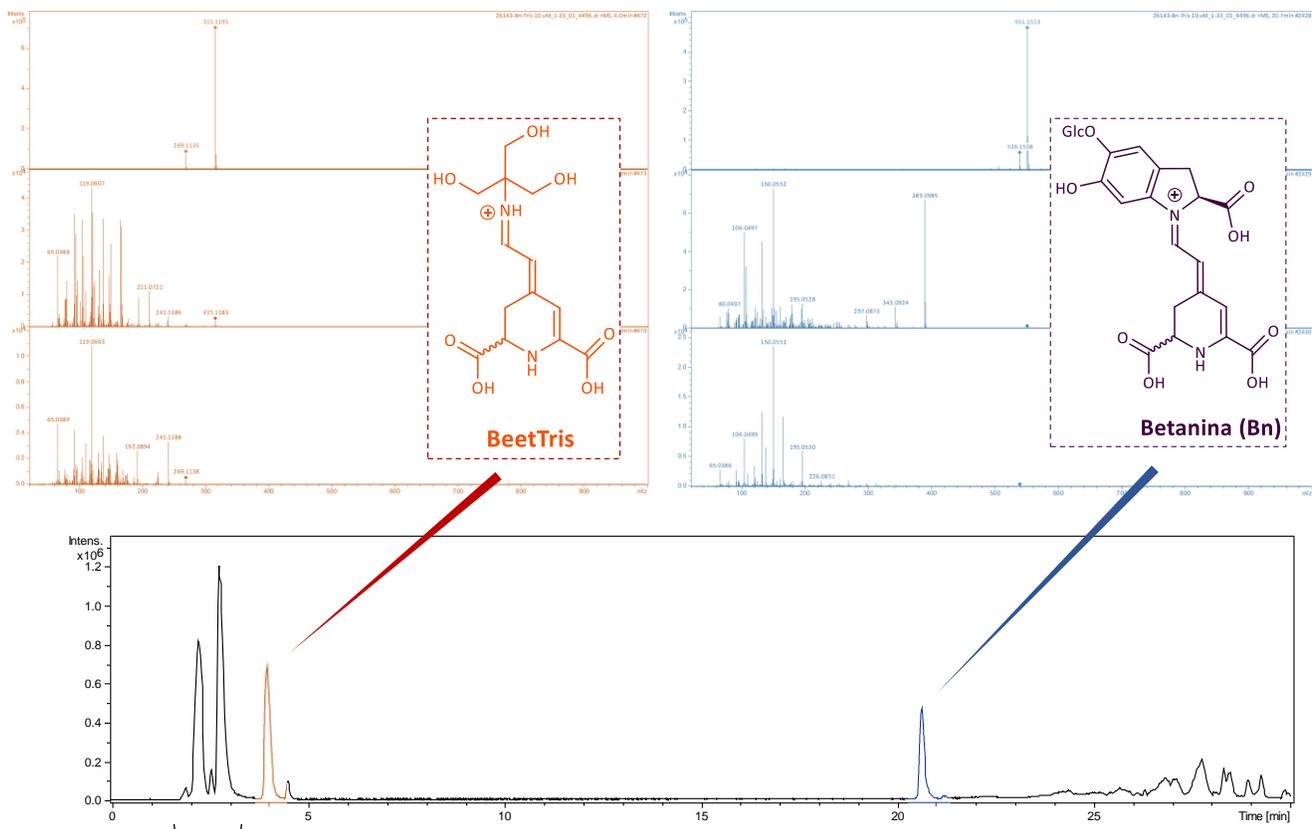
Figura 4.7. Cambio del perfil de absorción de la Bn (●), (Izquierda). Perfil cinético de descomposición de la Bn en 540 nm, y formación/descomposición del HBt (■) en 422 nm, (Derecha). Condiciones: 85 °C, [Bn] = 5.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8.5. $k_{\text{obs,Bn}} = 0.13 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{Bn}} = 5.0 \pm 0.3$ min; $k_{\text{obs1,HBt}} = 0.16 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{HBt1}} = 5.0 \pm 0.1$ min, $k_{\text{obs2, HBt}} = 0.019 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{HBt2}} = 42 \pm 4$ min.

Estudios de descomposición de la Bn a 85 °C en agua y pH 7.0 ha mostrado una disminución de la banda de absorción con máximo en 535 nm, y un apareamiento de una banda de absorción seguido de una disminución con máximo de absorción en 427 nm^{88,115}. De esa forma, es posible observar, en nuestro experimento, que el medio básico originó un desplazamiento batocrómico en la Bn ($\Delta\lambda_{bat}^{\vec{}} = 5$ nm), que puede ser originado por los aglicones, producto de la descomposición, y que son más lábiles y más propensos a la oxidación, lo que daría pérdidas del color y un posterior color dorado⁷³.

4.4. Descomposición de la betanina en medio tamponado con Tris

La betanina fue estudiada sobre un sistema tamponado de amina primaria, tampón Tris, a pH 8.5 (pKa=8.06)¹³⁵ a 40 °C por 2 horas y en ausencia de luz. El sistema de degradación de la Bn fue acompañado por HPLC-DAD-MS/MS(ESI+). El cromatograma y espectro de masas mostraron picos característicos en el $t_R = 4.0$ min, $m/z = 315.1195$ que corresponde a la betaxantina sintética BeetTris^{10,13}, y en el $t_R = 20.6$ min, $m/z = 551.1513$ que corresponde a la Bn^{10,115}. Los picos mostrados entre los $t_R = 2.5 - 3.5$ min, corresponderían a los productos de descomposición y tampón Tris¹¹⁵ (**Figura 4.8**).

En cromatogramas es difícil observar el HBt, debido a la grande inestabilidad en medios altamente ácidos ($\text{pH} \leq 2$)⁸⁷ o básicos ($\text{pH} \sim 10.5$)⁷⁸. En condiciones experimentales, realizadas en este experimento, en presencia del tampón Tris, no fue posible separar e identificar el HBt por las técnicas de cromatografía y espectrometría. De esa forma, fue necesario identificar el HBt por técnicas espectrofotométricas en 424 nm (agua)^{9,87} (**Figura 4.7**). Por otro lado, el ácido betalámico fue separado e identificado por HPLC-DAD-MS/MS(ESI+) en condiciones de $2 < \text{pH} < 3$ en ausencia de Tris, mostrando un $t_R \sim 20$ min y $m/z = 212.0556$ (**Figura S2**), resultados que fueron conferidos con la literatura científica¹³⁶.



Productos de degradación/Tris

Figura 4.8. Cromatograma de la **Bn** en tampón Tris (columna de fase reversa C18, 250 × 4.6 mm; sistema cromatográfico: 5 – 95% en 30 min, siendo el solvente A: 0.05% HCO₂H/agua y solvente B: 0.05% HCO₂H/MeCN), y espectrogramas de HPLC-DAD-MS/MS(ESI+) de los picos en $t_R = 4.0$ min (**BeetTris**), $m/z = 315.1195$; y $t_R = 20.6$ min (**Bn**), $m/z = 551.1513$. Tratamiento a 40 °C por 2 h en ausencia de luz.

La descomposición de la **Bn**, también fue acompañado por espectrofotometría en el rango visible de 300 – 650 nm, en presencia de la amina primaria Tris (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Este experimento fue desarrollado en ausencia de luz a 40 °C por 28 h (**Figura 4.9**). El perfil de absorción muestra el aumento de dos bandas de absorción con máximo en 456 nm y 477 nm, que es característico de la betaxantina artificial BeetTris¹⁰. En el entorno de 420 – 424 nm se observa levemente un hombro que corresponde al aumento de concentración del HBt, debido a la superposición de bandas. Por otro lado, la **Bn** en estas condiciones experimentales presenta un $k_{\text{obs,Bn/Tris}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ que es casi el doble de que cuando se encuentra en ausencia de Tris ($5.0 \pm 0.1) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, aumentando el tiempo de vida-media entorno de 45%^{10,88}.

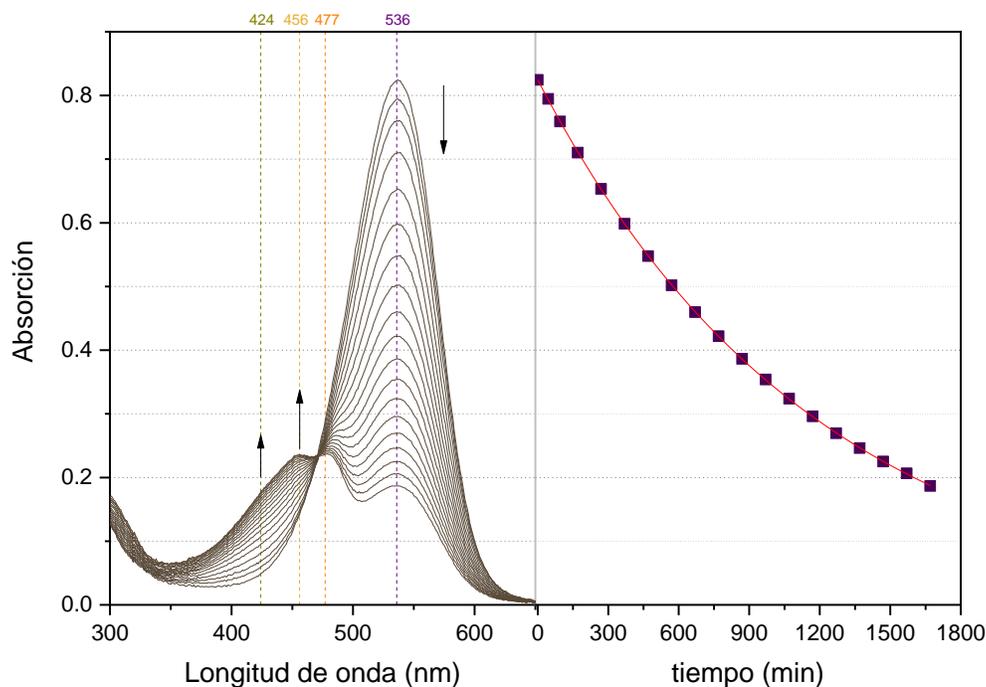
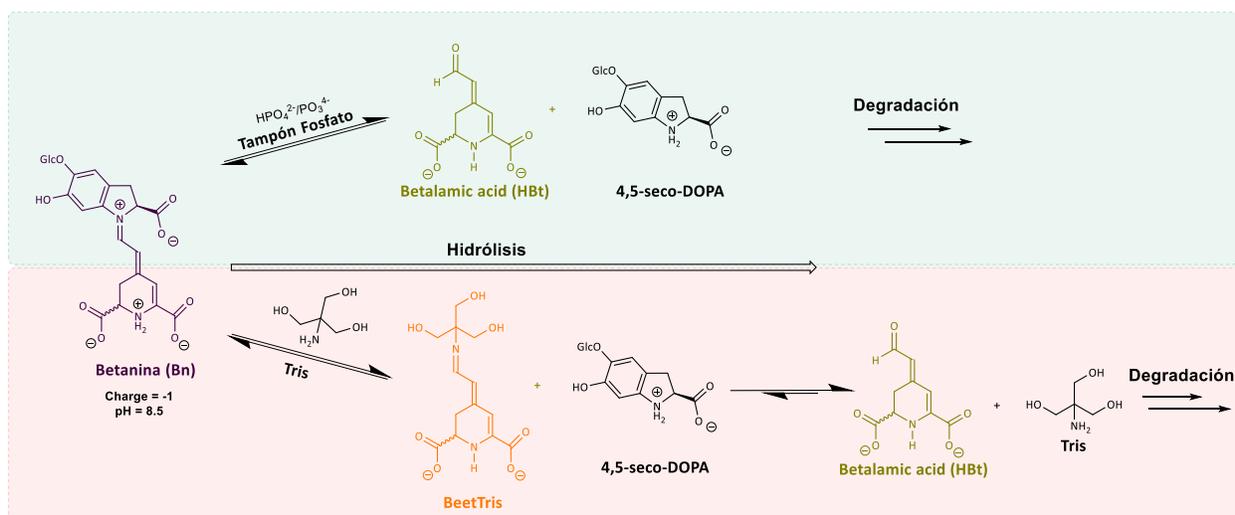


Figura 4.9. Cambio del perfil de absorción de la Bn (Izquierda), en 536 nm, en presencia del tampón Tris. En 424 nm, 456 – 477 nm corresponderían al HBt y a la BeetTris, respectivamente. Perfil cinético de descomposición de la Bn en 536 nm (■) (Derecha). Condiciones: 40 °C, [Bn] = 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [Tris] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8.5. $k_{\text{obs,Bn}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{Bn}} = 800 \pm 7 \text{ min}$.

La Bn hidroliza en medio alcalino, tanto en presencia de fosfato⁸⁸ y de Tris¹⁰. En estas condiciones ocurre la hidrólisis del enlace aldimínico, obteniendo subproductos de esta degradación el HBt y diversas aminas y/o aminoácidos que la caracterizan, incluido el *ciclo*-DOPA o *ciclo*-DOPA-glucósido¹⁷. La posible reversión de la reacción por condensación del HBt con las aminas y/o aminoácidos generados, producto de la hidrólisis, es inducido por la acidificación del medio¹¹⁵. Con el aumento de temperatura se cataliza la hidrólisis de la Bn, pero también la descomposición de los subproductos¹¹⁵ (**Esquema 4.2**).

Para entender e identificar la formación de la betalaína artificial, formada producto de la hidrólisis de la Bn en presencia de Tris, fue necesario realizar su semisíntesis¹⁰. Para tal objetivo se obtuvo inicialmente el HBt mediante la hidrólisis de la Bn en medio alcalino (pH 11.6 – 11.8), siguiendo protocolos descritos⁹.



Esquema 4.2. Hidrólisis de la Bn en tampón fosfato y en Tris. La betaxantina artificial (BeetTris) es formada inicialmente mediante la hidrólisis de la Bn, y simultáneamente por una adición nucleofílica del Tris, y subsecuentemente hidroliza formando HBt y Tris¹⁰.

4.5. Obtención del ácido betalámico

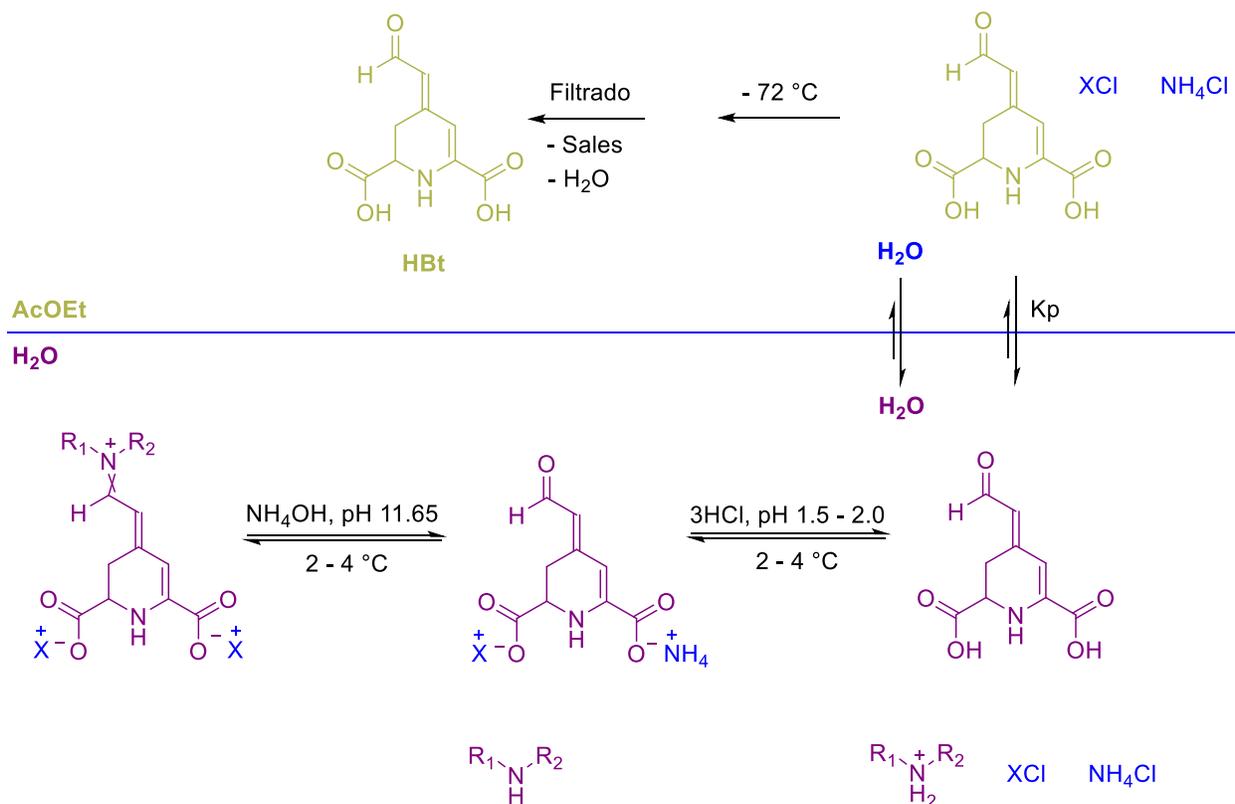
El HBt fue obtenido a partir de la hidrólisis alcalina del jugo de beterraga, seguido de una extracción con AcOEt de la fase acuosa acidificada (**Esquema 4.3**)^{8-10,72,115}.

Durante la extracción del HBt, existe un equilibrio envuelto entre el solvente orgánico ($\lambda_{abs}^{max} = 380 \text{ nm}$, AcOEt, $\epsilon_{380 \text{ nm}} = 2.46 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁹ y el acuoso ($\lambda_{abs}^{max} = 430 \text{ nm}$, agua pH = 11, $\epsilon_{430 \text{ nm}} = 2.65 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{9**}. El pH un factor importante para el rendimiento de la extracción en la fase acuosa. Cuando el pH ~2 es alcanzado, gran parte del HBt está en su forma neutra. Sin embargo, el rendimiento del HBt es bajo, esto es debido a que el equilibrio, descrito por coeficiente de partición (K_p), es desplazado para la fase acuosa. Este K_p está relacionado íntimamente con el equilibrio de partición del HBt entre las fases acuosa y orgánica¹¹⁵.

El jugo de beterraga bruta posee diversas betalaínas¹³² (representada de morado en la parte inferior izquierda del **Esquema 4.3**). La hidrólisis de las betalaínas en pH 11.65, con NH_4OH , genera el HBt (*amarillo-dorado*) en su forma totalmente desprotonada, así como aminas y sales. Secuencialmente, luego de la acidificación con HCl a pH 1.5 – 2.0, el HBt es llevado a su forma

** Otros autores han reportado¹⁷⁰ para el HBt en medio acuoso: $\lambda_{abs}^{max} = 424 \text{ nm}$, agua pH = 11, $\epsilon_{424 \text{ nm}} = 2.4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

totalmente protonada. Al mismo tiempo, las aminas presentes en el medio son llevadas para sus sales de amonio. El HBt, en su forma neutra, es extraído con AcOEt ($-72\text{ }^{\circ}\text{C}$)¹⁰ del medio acuoso, considerando que el K_p siempre es favorecido para el medio acuoso¹³². Luego de la extracción del HBt en AcOEt, esta podría haber sido secado con sales de Na_2SO_4 o MgSO_4 , pero debido a la alta afinidad del HBt en medio acuoso el producto se perdería substancialmente. La fase orgánica conteniendo el HBt es enfriado con AcOEt ($-72\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2/\text{EtOH}$) y finalmente filtrado rápidamente usando un embudo Büchner, para retirar las sales y el agua restante. El rendimiento promedio obtenido fue alrededor de 20%, con una concentración de 1.0 mmol L^{-1} , en relación a la Bn presente en el jugo de la betarraga ($\lambda_{abs}^{max} = 536\text{ nm}$, $\epsilon_{536\text{ nm}} = 6.5 \times 10^4\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)³⁰.



Esquema 4.3. Obtención del ácido betalámico, a partir de la hidrólisis básica de las betalainas del jugo de beterraga^{††}.

^{††}Adaptado de Mattioli, R.R. (2018)¹⁷¹. El ácido betalámico (HBt) puede ser sintetizado, sin embargo esa ruta podría involucrar múltiples etapas, obteniendo así bajos rendimientos ($< 4\%$)¹⁷².

4.6. Obtención de la betaxantina artificial

La betaxantina artificial fue semisintetizada¹⁰ con la finalidad de obtener un perfil de absorción involucrado en la hidrólisis de la Bn en medio de la solución de Tris, mostrado en la **Figura 4.10**. Además de obtener sus propiedades cinéticas de descomposición en condiciones alcalinas y de altas temperaturas^{‡‡}.

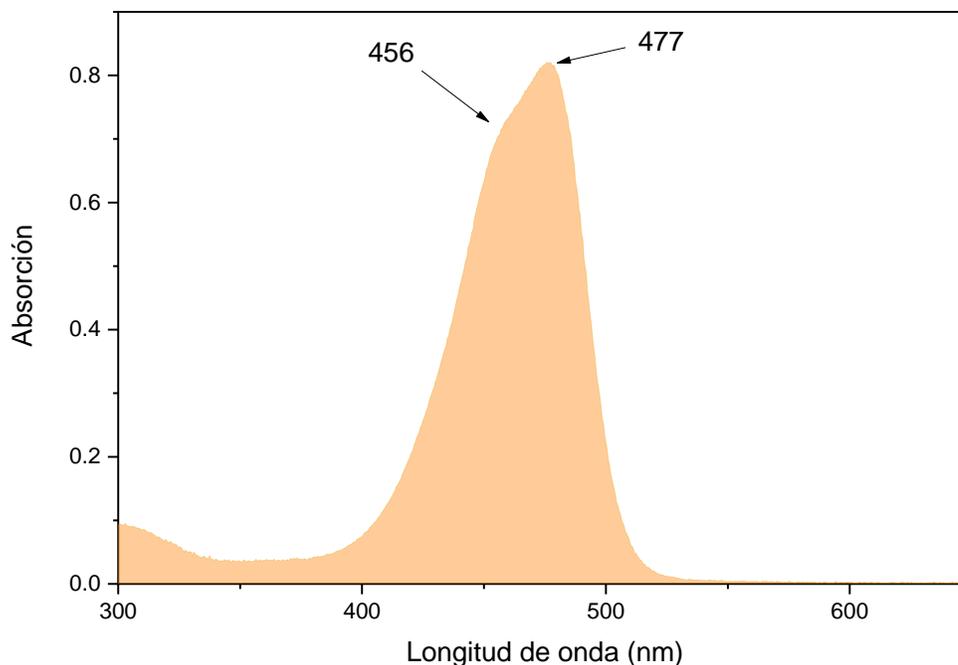


Figura 4.10. Espectro de absorción de la Beetris. [Bt] = 14.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda_{Bt}^{abs} = 477/456 \text{ nm}$ en pH = 5.0, T = 25 °C, $\epsilon = 5.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁰

La semisíntesis fue realizada mediante una reacción de tipo adición nucleofílica. La reacción de acoplamiento aldimínico entre la amina (nucleófilo, 4 equiv.) y aldehído (ácido betalámico, 1 equiv.) dio lugar a la formación de la imina (base de Shift), BeetTris (**Figura S3**). Debido a que el pH es un parámetro importante en la estabilidad de las iminas, la semisíntesis fue realizada en pH próximo de 5¹³⁷. Del mismo modo, se consideró en la semisíntesis de la imina la estabilidad influenciada por el pK_{aH} del producto final ($pK_{aH}=4.27$)^{§§}, ya que la imina desprotonada

^{‡‡} No fue posible obtener un perfil de descomposición a 85 °C, ya que este se descompone en tiempos prolongados rápidamente, en ese sentido fue necesario disminuir la temperatura hasta 40 °C.

^{§§} Parámetro calculado mediante el programa MarvinSketch.

disminuiría su polaridad, y por tanto estaría más propensa a sufrir hidrólisis, disminuyendo el rendimiento de reacción (12%). Los valores de los pK_{aH} para estas iminas frecuentemente son limitadas, y frecuentemente estos valores son de dos a cuatro unidades por debajo de las aminas precursoras (pK_{aH} , Tris = 8.06)¹³⁸. En ese sentido en pH básicos esta betaxantina sufre hidrólisis catalizada por el medio alcalino (**Figura 3.11**). Inicialmente la imina con el nitrógeno desprotonado, sufre un ataque del par de electrones del hidróxido al carbono de la imina, formando un intermediario carbinolamina, que posteriormente sufre el abandono del grupo amina (Tris)¹³⁷.

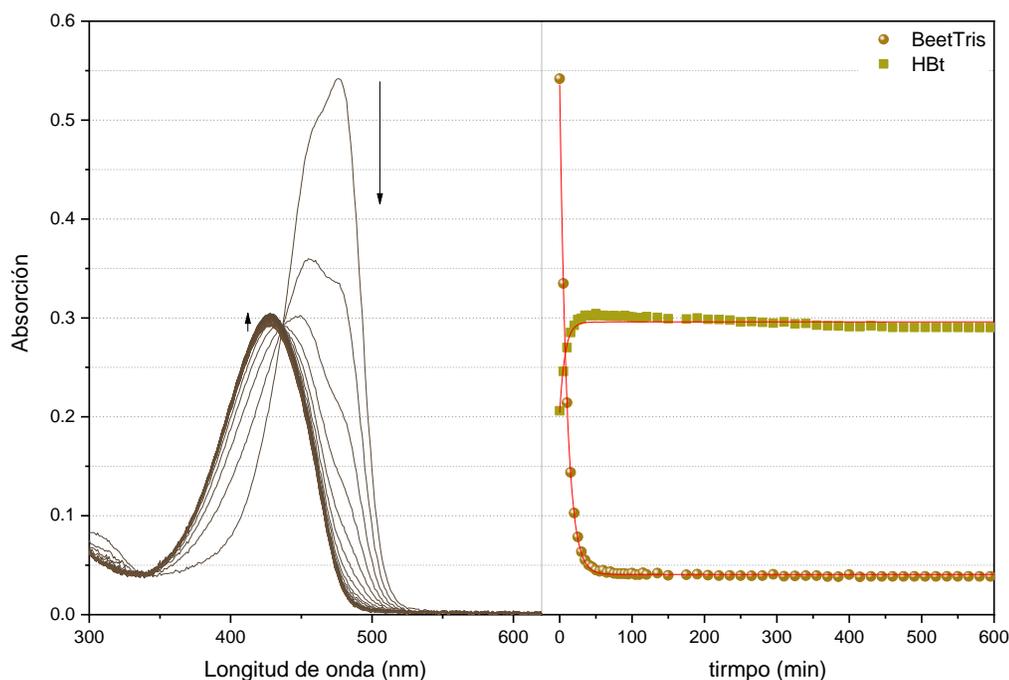


Figura 4.11. Cambio del perfil de absorción de la BeetTris (●), (Izquierda). Perfil cinético de descomposición de la BeetTris en 476 nm, y formación/descomposición del HBt (■) en 428 nm, (Derecha). Condiciones: 40 °C, [Bt] = 9.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8.5; $k_{\text{obs,Bt}} = 0.11 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{Bt}} = 6.6 \pm 0.2 \text{ min}$; $k_{\text{obs1,HBt}} = 0.14 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{HBt1}} = 5.0 \pm 0.1 \text{ min}$, $k_{\text{obs2, HBt}} = 0.038 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2, \text{HBt2}} = 142 \pm 8 \text{ min}$.

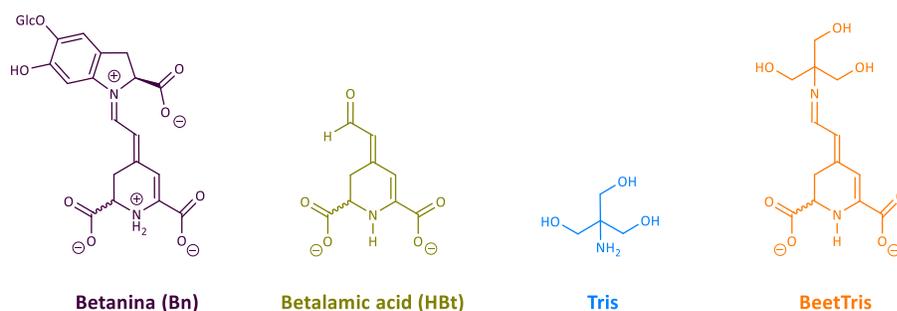
En la **Figura 4.11** se muestra el perfil de descomposición de la betaxantina artificial, BeetTris, en pH 8.5 a 40 °C en ausencia de Luz. En esas condiciones se muestra una rápida disminución de la banda con máximo de absorción en 477 nm, como respuesta a la hidrólisis. La concentración de betaxantina fue disminuida el 50% de su concentración en aproximadamente 7 min. Por otro lado, se observa un aumento y una cuasi estabilización de la banda de absorción en 428 nm correspondiente al HBt que, posee un tiempo de vida-media de casi 20 veces mayor de la imina que proviene.

4.7. Propiedades antioxidantes de las betalaínas

En esta sección se buscó entender como las características estructurales de las betalaínas estudiadas, podrían afectar sus propiedades antioxidantes. Las betalaínas fenólicas son antioxidantes potentes, así como las antocianinas. Por otro lado, las betalaínas no fenólicas, aunque menos antioxidantes, poseen una capacidad antiradicalar de casi dos veces más alta que el Trolox.

La capacidad de antirradicalar de las betalaínas, fue estimado usando la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), TEAC/ABTS^{+•} por colorimetría (método no enzimático)⁶³. En este ensayo, la reducción de ABTS^{+•} (verde) por antioxidantes se cuantificó durante un periodo de seis minutos y el cambio de la absorbancia a 734 nm fue usado para calcular el valor de TEAC.^{***} La Bn, una betacianina fenólica que se encuentra en la beterraga, es actualmente utilizada como colorante alimenticio (E162), y posee una gran capacidad antioxidante, presentando según estudios anteriores, TEAC = 4.7 ± 0.3 ¹³⁹. En algunas betalaínas (indicaxantina), en ausencia del anillo catecol monoglicosilado poseen valores de entorno de 1.6 ± 0.1 , que solamente puede estar asociado a la oxidación del núcleo del HBt, por vía sistema 1,7- diazaheptamético, o por la oxidación resultante de la descarboxilación, después de la descomposición de las betalaínas^{140–142}.

En ese sentido fue estudiado la capacidad antiradicalar de las betalaínas, Bn, BeetTris y HBt, así como de la base Tris (**Esquema 4.3**), para un efecto comparativo en condiciones de pH 7.4, como sugieren los protocolos descritos⁶³.



Esquema 4.3. Compuestos evaluados para la determinación de la capacidad antiradicalar por el método colorimétrico TEAC/ABTS^{+•}. Estructuras modeladas según el programa Marvin Sketch con pH 7.4 – 8.5.

^{***}La reacción de ABTS^{+•} con antioxidantes menos reactivos puede tardar más de 6 minutos en alcanzar el equilibrio, no fue el caso para nuestros experimentos¹⁷³.

El ensayo cinético del ABTS es basado en la habilidad de una especie antirradicalar para secuestrar el catión radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (radical catión del ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) de color azul-verde, y esta capacidad antirradicalar puede ser expresada como TEAC (en relación al Trolox)⁶³.

El catión radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ es estable y es preparado a partir de la oxidación de la sal ABTS, 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de amonio, con persulfato de potasio por 16 horas (antes del experimento) hasta obtener una solución azul oscura⁶³. En solución alcohólica o acuosa el $\text{ABTS}^{+\bullet}$ presenta cuatro máximos de absorción (414, 645, 734, 815 nm)¹⁴³. Nuestros ensayos fueron realizados en 734 nm evitar sobreposición entre las bandas con las betalainas¹¹⁶.

La capacidad antirradicalar fue determinada en tampón fosfato pH 7.4. Se midió la variación de absorción del $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en 734 nm después de seis minutos de la adición del antirradical. El valor obtenido fue relacionado con la concentración de antirradical (**Figura 4.12A**) y los valores de coeficiente de regresión lineal fueron comparados con el calculado para el Trolox para obtener el valor de TEAC (**Figura 4.12B**).

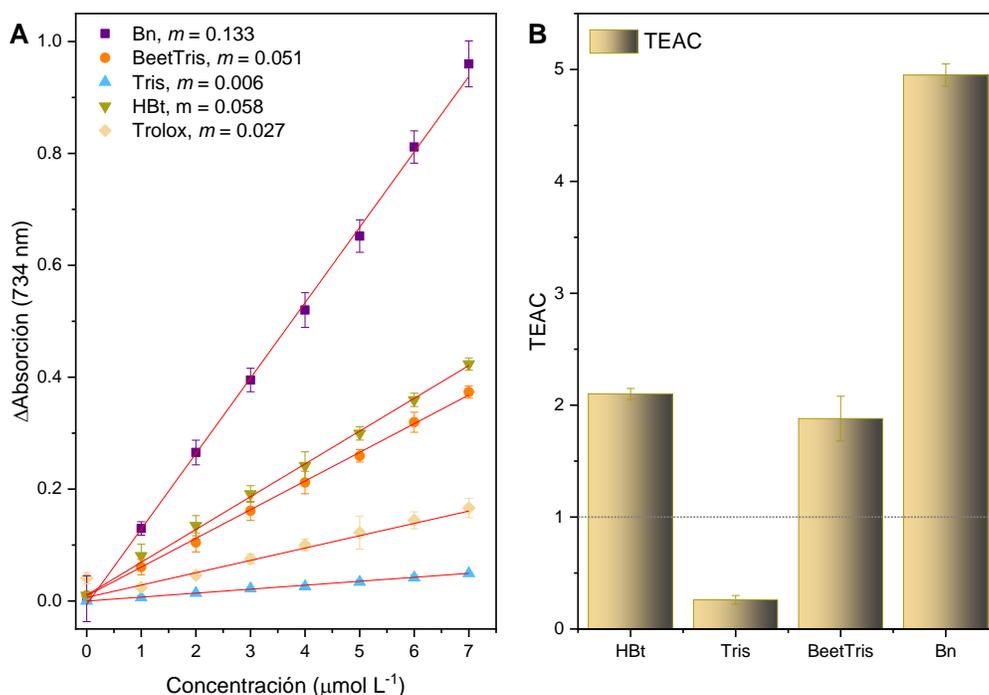


Figura 4.12. Correlación lineal de la variación de absorción en 734 nm del $\text{ABTS}^{+\bullet}$ en relación a la concentración de antirradical en tampón fosfato 7.4. Valores calculados de TEAC. El ajuste lineal de la media de un ensayo con $n = 4$.

El coeficiente de regresión lineal (m en $\mu\text{mol L}^{-1}$), y el coeficiente de determinación del ajuste de la curva (Adj- R^2): Trolox (0.027 ± 0.003 ; Adj- $R^2 = 0.991$), Bn (0.133 ± 0.005 ; Adj- $R^2 = 0.998$), BeetTris (0.051 ± 0.001 ; Adj- $R^2 = 0.999$); Tris (0.006 ± 0.001 ; Adj- $R^2 = 0.998$); HBt (0.058 ± 0.001 ; Adj- $R^2 = 0.999$).

El valor de TEAC para la Bn fue de 4.9 ± 0.1 que es similar a los valores descritos en la literatura (~ 4.8)³¹. El TEAC para la HBt fue de 2.1 ± 0.1 , siendo menor a los encontrados en la literatura 2.7, esta diferencia podría ser debido las variaciones de pH ($7.0 \rightarrow 7.4$)¹⁴⁴. Del mismo modo, el BeetTris muestra un valor de TEAC de 1.9 ± 0.2 . Estos valores de TEAC, para el HBt y BeetTris, muestran la importancia de la porción fenólica de la Bn en la capacidad antirradicalar de las betalainas frente al ABTS^{•+}. Sin embargo, no se puede dejar de observar la importancia de la porción betalámica, ya que los valores, tanto para HBt y BeetTris obtuvieron valores próximos de TEAC a 2, y no presentan porción fenólica. Por otro lado, el valor de TEAC para el Tris^{†††} es bajo 0.2 ± 0.1 , lo que indica que la porción betalámica contribuye bastante para la capacidad antirradicalar del HBt y BeetTris. En ese sentido, se puede afirmar que las betalainas no fenólicas ensayadas (HBt, BeetTris), poseen alta capacidad antirradicalar¹⁴⁰. Sin embargo, la fracción fenólica de la Bn incrementa en más de 2 veces la actividad antirradicalar que el HBt y BeetTris.

Para la Bn, el grupo hidroxilo 5-*O*-glucosilado del *ciclo*-DOPA se conjuga con la porción de 1,7-diazaheptametinio, pero no con el grupo 6-OH, apuntando a múltiples sitios de oxidación¹⁴⁵. La fracción fenólica, 1,7-diazaheptametinio y el anillo de 2-piperidina puede ser crucial para la actividad antirradicalar de la Bn. Siendo la parte más importante para betalainas no fenólicas la fracción 1,7-diazaheptametinio para poseer actividad antirradicalar¹¹⁶.

En esta sección se debe tener presente que las variaciones de los valores de TEAC, con respecto a la literatura, deben ser debido a que las betalainas hidrolizan en medio acuoso catalizado por el medio alcalino del tampón fosfato a pH 7.4 (catálisis nucleofílica), al mismo tiempo considerar que las constantes observadas de degradación para la el HBt es menor que para el BeetTris^{10,88}.

††† No se consiguió evaluar el valor del *ciclo*-DOPA, por la indisponibilidad comercial, y la dificultad en separar debido a su estabilidad.

4.8. Ensayos en células humanas

Fue utilizado el ensayo de MTS/PES ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna]/etosulfato de fenazina) para determinar los efectos de las betalaínas en la viabilidad de las células de linaje HeLa y HepG2 (**Figura 4.13**). El ensayo MTS se basa en la conversión de una sal de tetrazolio en un producto formazán soluble acuoso coloreado por la actividad mitocondrial de las células viables a 37 °C. Brevemente, en este ensayo, el NADPH y el NADH producidos por las enzimas deshidrogenasa en las células metabólicamente activas (bio)reducen el compuesto tetrazolio MTS (reactivo de Owen), en presencia de etosulfato de fenazina^{††††}(PES), en un producto formazán que es soluble en medio de cultura de tejidos, que es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo y se pueden medir por espectrofotometría en 490 nm^{146,147c}.

En las concentraciones ensayadas (0 – 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), Tris, Bn y BeetTris no mostraron pérdida de viabilidad significativa, para ambas líneas celulares inmortalizadas de cáncer cervical e hígado humano, HeLa y HepG2, respectivamente; salvo en las células HeLa por acción del BeetTris en las concentraciones de 4.0 y 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. El LSS (lauril sulfato de sodio) ha sido evaluado como control positivo de citotoxicidad para ambas líneas celulares.

Las betalaínas, hasta antes de los ensayos celulares fueron conservados a – 20 °C y en ausencia de luz. Para evitar contaminación por microorganismos, estos fueron filtrados usando filtros de membrana con poros de 0.22 μm . Para evitar factores de descomposición, y antes incubar en la cultura celular fue rápidamente llevado a 37 °C. Las concentraciones evaluadas no se aproximan a un cálculo de IC50, ya que el objetivo fue evaluar en bajas concentraciones el fenómeno de citotoxicidad, evitando la muerte celular por necrosis. Aunque ensayos para conferir la apoptosis no fueron realizados, amplia literatura sugiere el mecanismo pro- o apoteótico de las betalaínas, aun para concentraciones cercanas a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.¹²

[†] El etosulfato de Fenazina es un regulador del metabolismo de lípidos. A través de la oxidación de NADPH, estimula la vía de la pentosa-fosfato y así inhibe la síntesis de ácidos grasos, pudiendo llevar a efectos beneficiosos, p.e. en embriones bovinos producidos *in vivo*¹⁷⁴.

[°] Ensayos por citometría de flujo fue una alternativa para la determinación de la viabilidad celular. Aunque el rendimiento cuántico es bajo para las betalaínas estudiadas, estas podrían originar falsos positivos por variaciones en el voltaje del equipamiento.

La citotoxicidad de betalaínas de otras fuentes de pigmentos también han sido relatados. Por ejemplo, se ha demostrado que extractos de betalaínas de la tuna (*Opuntia ficus indica*) pueden inhibir y crecimiento e inducir apoptosis en varias líneas celulares inmortalizadas epiteliales de ovario, cuello uterino y vejiga; mostrando un efecto variable que dependía de la dosis y del tiempo. Es decir, para 5% de extracto las betalaínas fueron capaces de inhibir el crecimiento en la cultura celular, pero para concentraciones altas de 5% – 25% fue capaz de promover efecto apoptótico⁶⁸.

De igual manera, para betalaínas y betaxantinas extraídas de *Rivina humilis*, fue mostrado un efecto citotóxico dependiente del tiempo antes de 24 h y 48 horas, respectivamente⁴³. Aunque la betanina es en determinadas concentraciones es capaz de alterar la integridad de la membrana mitocondrial, así como iniciar la activación de caspasas para la desintegración nuclear⁶⁸, en nuestro ensayo bajo las concentraciones y en 24 h de incubación a 37 °C, no fue capaz de mostrar tal efecto citotóxico. La Bn de *Beta vulgaris* posee actividad inmunosupresora y antiinflamatorias. En glóbulos rojos, también ha sido demostrado, que betaxantinas y betacianinas pueden ofrecer resistencia a la hemólisis⁶⁰.

Por otro lado, efectos de la betaxantina, BeetTris, no han sido hasta el momento reportado sobre su citotoxicidad. Es claro que existe una dependencia de esta betaxantina, prácticamente inestable ($t_{1/2} < 4$ h), con el tiempo de incubación y con la naturaleza de la interacción con componentes biológicos. Pues es difícil observar un comportamiento citotóxico coherente en 24 h, especialmente cuando este compuesto hidroliza formando otra sustancia (HBt) que podría reaccionar fácilmente con aminos o aminoácidos y formar otras sustancias menos o más tóxicas en un medio de cultura celular. En ese sentido, es difícil afirmar en este experimento que, la citotoxicidad por BeetTris para concentraciones en 4 – 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, comienza a ejercer un efecto citotóxico por causa específicamente de la betalaína artificial.

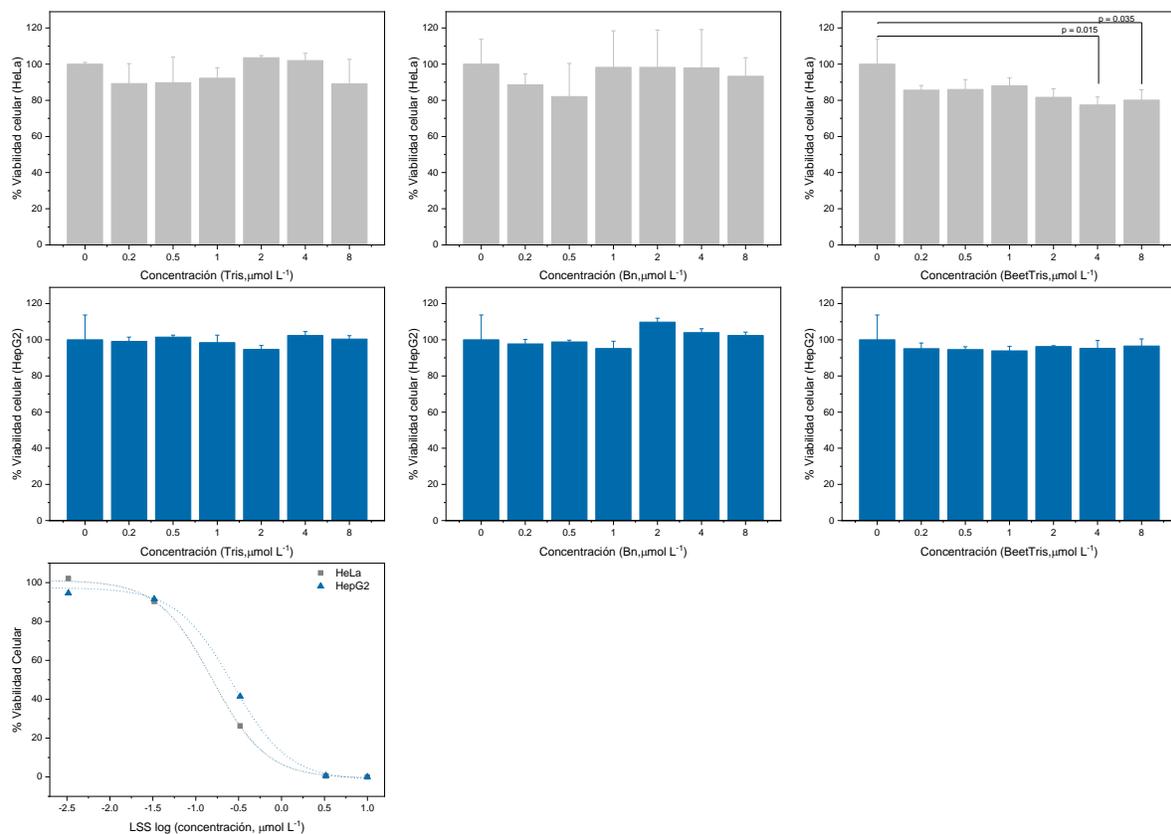


Figura 4.13. Viabilidad celular determinado por el método colorimétrico MTS. Células inmortalizadas de cáncer cervical (HeLa) (■). Células inmortalizadas de carcinoma hepatocelular (HepG2) (▲). Condiciones: las concentraciones de los compuestos (Tris, Bn y Bx) fueron desde 0 – 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dilución seriada), ensayos a 37 °C por 24 h, a pH 7.4. Viabilidad celular de las líneas celulares HeLa y HepG2 frente al compuesto LSS (lauril sulfato de sodio, control positivo en los ensayos de viabilidad) (==). Condiciones: concentraciones de 0, 0.0033, 0.033, 0.33, 3.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ensayos a 37 °C por 24 h, a pH 7.4. Sin diferencias significativas: HeLa (Tris, $p=0.231$; Bn, $p=0.823$), HepG2 (Tris, $p=0.379$; Bn, $p=113$; BeetTris, $p=0.899$); con diferencias significativas HeLa (BeetTris, $p=0.023$). ANOVA, $n=3^{2x}$.

4.9. Ensayos de interacción con ADN

La electroforesis en gel es una técnica poderosa para caracterizar y separar las especies iónicas moleculares o coloidales solvatadas en función de sus movilidades electroforéticas. Estas especies se cargan en pozos en un gel elástico nanoporoso sumergido en una solución tampón electrolítica^{148–151}, y luego se aplica un campo eléctrico entre dos electrodos inertes (– → +). Para

analizar el ADN y ARN polianiónico, esta técnica es una tecnología extremadamente importante, que proporciona mediciones de alta resolución de longitudes de ácidos polinucleicos^{φ152,153}.

El principio de electroforesis utilizado para la separación de ADN se basa en la carga negativa general de una cadena de ADN. Por lo tanto, los iones libres, las moléculas de ADN o los fragmentos de ADN en una solución se pueden separar aplicando un cierto voltaje. Al final del proceso, las cadenas de ADN estarán cerca del cátodo (positivo), que atrae, debido a la polaridad, moléculas cargadas negativamente. El gel de agarosa forma una malla formada por una red de polisacáridos que permite la migración de moléculas. Las moléculas de menor peso molecular tendrán un tiempo más fácil para cruzar la malla de gel, posicionándose así más cerca del cátodo (+ o parte inferior); mientras que las moléculas con mayor peso tienen mayor dificultad y se colocan más cerca del ánodo (–, parte superior). La distancia que de recorrido el fragmento desde el punto de aplicación se compara con la distancia que otros fragmentos de tamaños conocidos que han cubierto en el mismo gel. Estos son marcadores de tamaño molecular (Ladder = Escaleras), que son mezclas de tramos de ADN con diferentes tamaños (kb)^{148–153}.

La longitud completa de ADNc de CadControl, fue comparado con “*Callinectes sapidus* arginine kinase mRNA” (1256 bp, GenBank acceso número [AF233355.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AF233355.1))¹⁵⁴ y fue amplificado por PCR, a partir del ARNm extraído del pedúnculo ocular (PO) de cangrejos de la especie de *Callinectes danae* (**Figura S4**). La secuencia de ADNc de CadControl tuvo una identidad del 99.32% según el banco de datos fornecidos por la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El ADNc identificado (350–400 kb) fue sometido a un ensayo de electroforesis en gel de agarosa para verificar la correcta amplificación después de ensayo de PCR (**Figura 4.14**).

^φ Es posible seguir los fundamentos de electroforesis vía este link ■

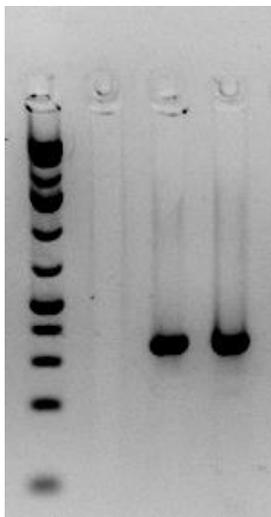


Figura 4.14. Gel de agarosa revelado en el trasluminador, después del ensayo de PCR del ADN extraído con los primers AKR y AKF, para verificar si el ADNc fue bien amplificado.

Fueron realizados dos experimentos aplicando la técnica de electroforesis en gel de agarosa, para estudiar la interacción entre las betalaínas (Bn, BeetTris) con el ADNc.

Inicialmente, el ARN extraído fue amplificado mediante el ensayo de PCR para obtener el ADNc. Enseguida, el ADNc fue mezclado con la betalaína ($C_i = 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $C_f = 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0$ y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) para luego realizar el ensayo de electroforesis en gel de agarosa.

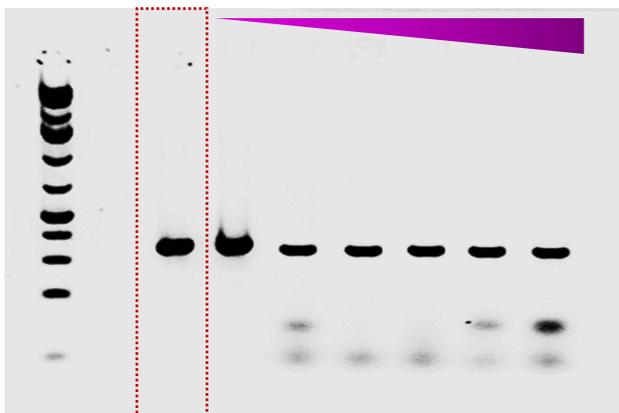


Figura 4.15. Bandas de migración de ADNc: La primera columna corresponde al marcador de tamaño molecular en escalera (Ladder). La columna encerrada en rojo corresponde a la migración control del ADNc. Las columnas siguientes son las evaluadas con Bn: $0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0$ y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aplicación posPCR.

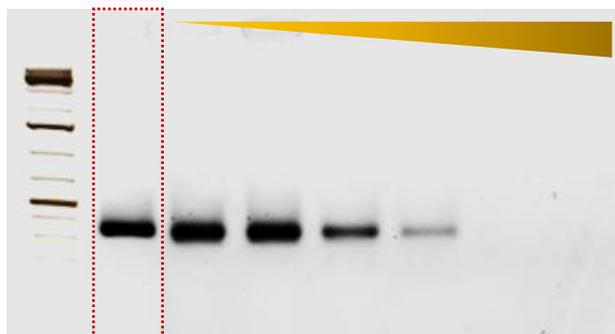


Figura 4.16. Bandas de migración de ADNc: La primera columna corresponde al marcador de tamaño molecular en escalera (Ladder). La columna encerrada en rojo corresponde a la migración control del ADNc. Las columnas siguientes son las evaluadas con BeetTris: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Aplicación posPCR.

En la **Figura 4.15**, para las concentraciones evaluadas de Bn, no es posible observar ninguna variación en las bandas cuando son comparados con el control, desde la distancia de migración o tamaño de los fragmentos. Las líneas inferiores son identificadas comúnmente como dímeros de primer o “*chain pinning*” del ADN¹⁵⁵.

El mismo experimento fue evaluado con BeetTris, manteniendo las mismas condiciones experimentales (tiempo, concentraciones, y ausencia de luz). En la **Figura 4.16** se muestra, para las concentraciones evaluadas de la betaxantina artificial que, a partir de la concentración de 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ el ADNc sufre una visual degradación, por la disminución progresiva de las bandas o fragmentos; este fenómeno es observado hasta la concentración 4.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Otros experimentos fueron realizados, cuando la betalaína ($C_i = 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25, 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $C_f = 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0$ y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) fue adicionada a la mezcla de primers^Ψ y ADN extraído, para luego seguir el ensayo de amplificación por PCR.

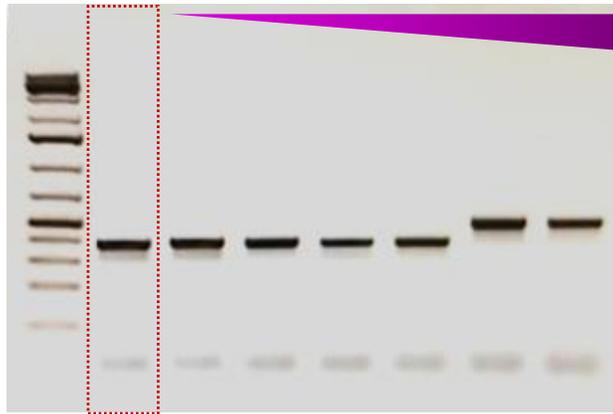


Figura 4.17. Bandas de migración de ADNc: La primera columna corresponde al marcador de tamaño molecular en escalera (Ladder). La columna encerrada en rojo corresponde a la migración control del ADNc. Las columnas siguientes son las evaluadas con Bn: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aplicación prePCR.

En la **Figura 4.17** se puede observar en las dos últimas concentraciones evaluadas de Bn (2.0 y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) se experimenta una retención de la banda de ADNc o cambio de la movilidad electroforética ($\sim 50 \text{ kb}$)¹⁵⁶, sugiriendo una posibilidad de interacción del ADNc con la Bn. Por otro lado, manteniendo las mismas condiciones experimentales, el efecto del BeefTris cuando esta es incluida en la mezcla reaccional de amplificación, no fue posible observar bandas en el ensayo de electroforesis (**Figura 4.18**), dando la posibilidad de una degradación del ADNc en el gel de agarosa o una interacción con la mezcla reaccional inicial de primers/ADN.

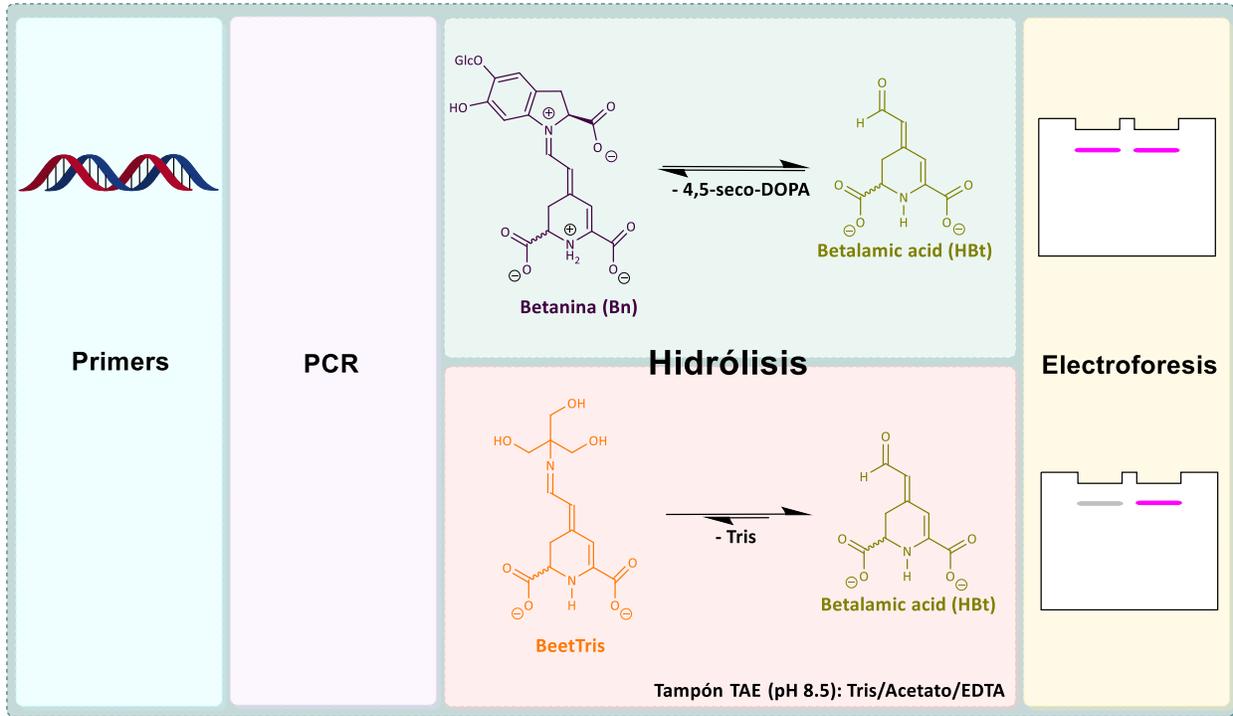
^Ψ Los primers utilizados, fueron específicos para el género *Callinectes*.



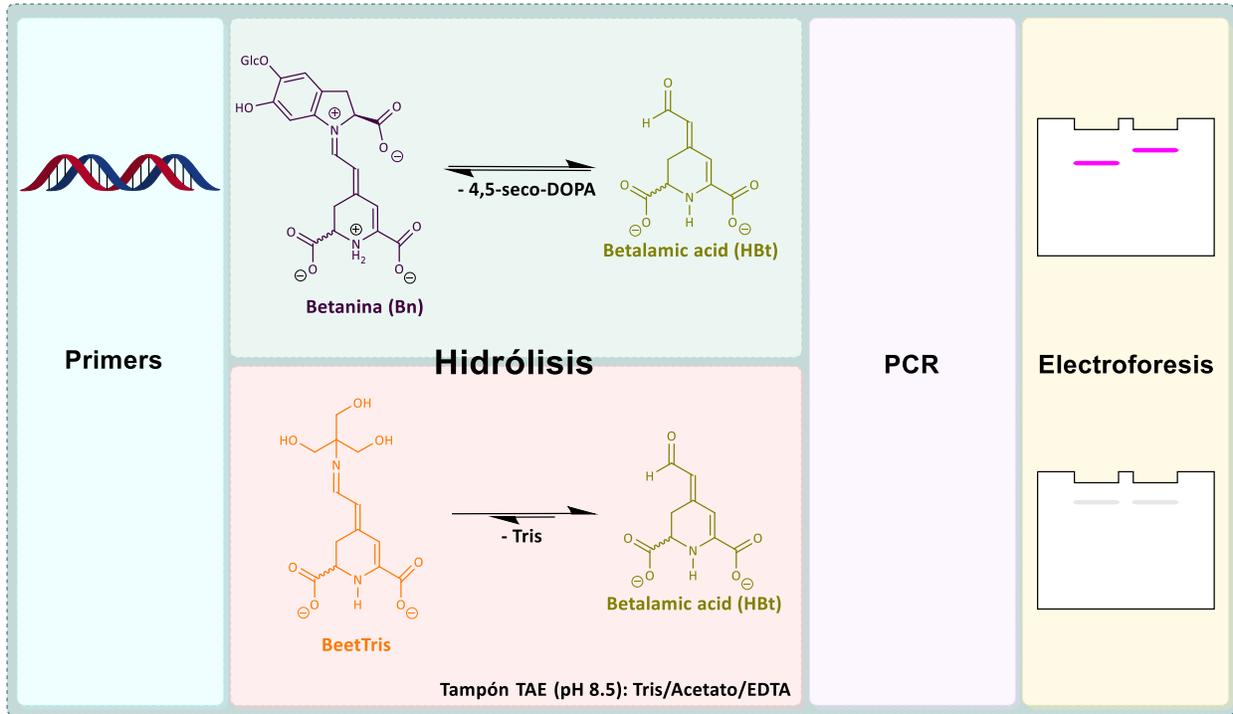
Figura 4.18. Bandas de migración de ADNc: La primera columna corresponde al marcador de tamaño molecular en escalera (Ladder). La columna encerrada en rojo corresponde a la migración control del ADNc. Las columnas siguientes son las evaluadas con BeetTris: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Aplicación prePCR.

En estos dos grupos de experimentos se pudo observar que, la interacción de las betalaínas y ADNc no es completamente pura, pues es claro considerar que el tiempo de electroforesis es suficiente para obtener una degradación de las betalaínas en sus productos de descomposición, incluso en un ambiente con pH 8.5⁸⁸ (**Esquema 4.4**).

Por otro lado, cuando la betalaína es mezclada con los reactivos, primers y ADN para su amplificación (PCR), el tiempo en condiciones de pH 8.5 son mayores, e incluso la temperatura del termociclador oscila entre 54 – 72 °C por casi 4 horas. Esta exposición de las betalaínas en estas condiciones, pueden ser suficientes para obtener mezclas de Bn/HBt/*ciclo*-DOPA y productos de degradación⁸⁸, que podrían estar interaccionando durante el ensayo de PCR con los primers/ADN, mostrando en el ensayo de electroforesis otro comportamiento de migración de bandas diferentes a los observados en la **Figura 4.15**. Por otra parte, cuando el BeetTris es tratado en el ensayo de PCR, es posible que los productos de degradación (HBt en mayor proporción) ocasionen interferencia con los reactivos de amplificación y/o ADN, y de esa forma no se podría observar bandas de migración electroforética (**Esquema 4.5**). Los ensayos de descomposición en de las betalaínas fueron acompañados por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (**Figura S4 – S5**).



Esquema 4.4. Interacción de las betalaínas y el ADN. Inicialmente el proceso de PCR es realizado para obtener ADN complementario; las betalaínas son adicionadas ($0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0$ y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), para finalmente realizar el proceso de electroforesis en gel.



Esquema 4.5. Interacción de las betalaínas y el ADN. Inicialmente las betalaínas ($0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0$ y $4.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) son adicionadas al ADN/Primers, en seguida se lleva a cabo el proceso de PCR, y subsecuentemente la electroforesis en gel de agarosa.

Los ensayos mostrados en la **Figura 4.15 – 4.18** fueron analizados por secuenciamiento de las bases del ADNc^{157,158}. Los nucleótidos y sus aminoácidos fueron alineados (**Figura S6**). Los resultados en todos los ensayos no mostraron desnaturalización del ADNc. La interferencia mostrada por la Bn en el ensayo de electroforesis y de PCR, sugiere que esta betalaína no reacciona con los reactivos de amplificación de ADNc (enzimas, primers, etc.). La Bn en las condiciones de electroforesis (t = 1h, T = 25 °C) posee un tiempo de vida-media de $t_{1/2} > 130$ h. Este resultado puede mostrar que la Bn sufre mínimamente descomposición por hidrólisis en el medio alcalino. Por otro lado, en la mezcla reaccional Bn-reactivos de amplificación, la Bn mantiene un $t_{1/2}$ promedio de 400 min, aproximadamente. De esta forma, se sugiere que, la Bn se mantiene significativamente estable durante el ensayo de electroforesis y amplificación.

Los aldehídos pueden reaccionar con las bases del ADN mediante reacciones de adición nucleofílica. Estos compuestos endógenos, originados por estrés oxidativo, pueden originar daño en el ADN, formando aductos derivados de aldehídos-ADN que pueden inhibir su reparación^{159,160}. Los aldehídos son compuestos electrófilos, que pueden reaccionar preferencialmente con aminas primarias por diversos mecanismos¹⁶¹. Estos pueden reaccionar con las bases del ADN que incluso mantiene un orden de reactividad (timina>citosina>guanina>adenina) y estabilidad (adenina>guanina> citosina>timina)¹⁶².

En el ensayo con BeetTris, la interacción con el ADN, también no origina alguna modificación o degradación por actividad oxidante o prooxidante, el cual se puede mostrar en el ensayo de secuenciamiento (**Figura S6**), que no es fácilmente visualizado en el ensayo de electroforesis (**Figura 4.16 – 4.18**). La betalaína artificial en las condiciones experimentales de PCR, puede descomponerse completamente ($t_{1/2} \ll 6$ min), formando HBt en la mezcla reaccional de amplificación. El BeetTris puede reaccionar con las aminas primarias, inhibiendo la amplificación del ADN, sin causar degradación o desnaturalización. Por otro lado, la betalaína BeetTris en las condiciones de electroforesis (T = 25 °C, pH 8.5), forma entre 30 – 50% de ácido betalámico durante el experimento. Este producto, por consecuencia de la hidrólisis alcalina, puede interaccionar con el ADNc amplificado, o con la sonda bromuro de propidio (**Figura 4.16**), ya que el ADNc está completo (sin degradación). La sonda intercaladora de ADN, puede formar bases de shift con aldehídos¹⁶³, de esta forma el HBt puede estar reaccionando con la sonda inhibiendo su

marcación. Este ensayo de inhibición fue mostrado en trabajos anteriores, donde se demuestra la interferencia de la sonda por BeetTris/HBt mostrando una disminución de la fluorescencia¹⁰.

5. CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio sobre los subproductos originados debido a la hidrólisis en medio alcalino de la betanina.

Se ha extraído, purificado y caracterizado la betanina, a partir del jugo de betarraga *Beta vulgaris*.

Como producto de la hidrólisis alcalina de la betanina fue obtenido el ácido betalámico, y por adición nucleofílica con la base Tris, se obtuvo una betalaína artificial BeetTris, que confiere el producto secundario obtenido, a partir de la reacción de la Bn en medio de tampón biológico.

Se ha determinado la actividad antiradicalar, así como su actividad citotóxica en dos modelos de células inmortalizadas, mostrando una leve y significativa citotoxicidad por parte de la betalaína artificial/HBt sobre las células HeLa, a pesar que todas las betalaínas muestran actividad antiradicalar, sugiriendo alguna ruta apoptótica.

Las betalaínas, pueden unirse o interactuar con el ADN sin originar alguna degradación o desnaturalización, actividad oxidante o prooxidante, sin desconsiderar que, los productos de su descomposición pueden interferir en el proceso de amplificación y análisis electroforético vía formación de bases de shift.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liebisch, H., Matschiner, B., fur, H. S.-Z. & 1969, undefined. Beitrage zur physiologie und biosynthese des betanins. *agris.fao.org*
2. Fischer, N. & Dreiding, A. S. Biosynthesis of Betalaines. On the Cleavage of the Aromatic Ring during the Enzymatic Transformation of Dopa into Betalamic Acid. *Helv. Chim. Acta* **55**, 649–658 (1972).
3. Qin, C. & Clark, A. E. DFT characterization of the optical and redox properties of natural pigments relevant to dye-sensitized solar cells. *Chem. Phys. Lett.* **438**, 26–30 (2007).
4. Dumbravă, A., Enache, I., Oprea, C. I., Georgescu, A. & Gîrțu, M. A. *Toward A More Efficient Utilisation Of Betalains As Pigments For Dye-Sensitized Solar Cells. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **7**,
5. Sandquist, C. & McHale, J. L. Improved efficiency of betanin-based dye-sensitized solar cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **221**, 90–97 (2011).
6. Calogero, G. *et al.* Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. *Sol. Energy* **86**, 1563–1575 (2012).
7. Oprea, C. I., Dumbrava, A., Enache, I., Georgescu, A. & Gîrțu, M. A. A combined experimental and theoretical study of natural betalain pigments used in dye-sensitized solar cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **240**, 5–13 (2012).
8. Gonçalves, L. C. P., Da Silva, S. M., DeRose, P. C., Ando, R. A. & Bastos, E. L. Beetroot-Pigment-Derived Colorimetric Sensor for Detection of Calcium Dipicolinate in Bacterial Spores. *PLoS One* **8**, e73701 (2013).
9. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS One* **8**, e53874 (2013).
10. Vitorino, H. A. & Bastos, E. L. Betanina em tampões de Good : hidrólise e formação de sonda fluorescente (Tese de Mestrado). (Universidade Federal do ABC, 2018).
11. Lin, S. M. *et al.* Structural identification and bioactivities of red-violet pigments present in *Basella alba* fruits. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10364–10372 (2010).
12. Khan, M. I. Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 316–330 (2016).
13. Terradas, F. & Wyler, H. 2,3- and 4,5-Secodopa, the Biosynthetic Intermediates Generated from L-Dopa by an Enzyme System Extracted from the Fly Agaric, *Amanita muscaria* L., and Their Spontaneous Conversion to Muscaflavin and Betalamic Acid, Respectively, and Betalains. *Helv. Chim. Acta* **74**, 124–140 (1991).
14. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. & Francis, F. J. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**, 173–289 (2000).

15. Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* **54**, 733–749 (2008).
16. Stintzing, F. C. & Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* **15**, 19–38 (2004).
17. Gandía-Herrero, F. & García-Carmona, F. Biosynthesis of betalains: Yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* **18**, 334–343 (2013).
18. Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 514–525 (2007).
19. Svenson, J., Smallfield, B. M., Joyce, N. I., Sansom, C. E. & Perry, N. B. Betalains in red and yellow varieties of the andean tuber crop ulluco (*Ullucus tuberosus*). *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7730–7737 (2008).
20. Castellanos-Santiago, E. & Yahia, E. M. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5758–5764 (2008).
21. Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Escribano, J. & García-Carmona, F. Fluorescence detection of tyrosinase activity on dopamine-betaxanthin purified from portulaca oleracea (common purslane) flowers. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2523–2528 (2009).
22. F.C. Stintzing & R. Carle. Analysis of betalains Food colorants. Chemical and functional properties. *Ed. C. Socaciu. CR Press Taylor Fr. Gr.* 507–520 (2008).
23. Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytol.* **190**, 854–864 (2011).
24. Broun, P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: A complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 272–279 (2005).
25. Leonard, A. S. & Papaj, D. R. ‘X’ marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Funct. Ecol.* **25**, 1293–1301 (2011).
26. Schaefer, H. M., Schaefer, V. & Levey, D. J. How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 577–584 (2004).
27. Felker, P. *et al.* Colour inheritance in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits. *Ann. Appl. Biol.* **152**, 307–318 (2008).
28. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. Botany: Floral fluorescence effect. *Nature* **437**, 334 (2005).
29. Khan, M. I. Stabilization of betalains: A review. *Food Chem.* **197**, 1280–1285 (2016).
30. Gonçalves, L. C. P. *et al.* Betalaínas: Das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Rev. Virtual Química* **7**, 292–309 (2015).

31. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta* **232**, 449–460 (2010).
32. Wang, C. Q., Chen, M. & Wang, B. S. Betacyanin accumulation in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L. is induced by watering roots with H₂O₂. *Plant Sci.* **172**, 1–7 (2007).
33. Schliemann, W. *et al.* Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry* **42**, 1039–1046 (1996).
34. Heuer, S. *et al.* Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry* **37**, 761–767 (1994).
35. Brockington, S. F., Walker, R. H., Glover, B. J., Soltis, P. S. & Soltis, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytol.* **190**, 854–864 (2011).
36. Stafford, H. A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.* **101**, 91–98 (1994).
37. Hempel, J. & Böhm, H. Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var. *lutea* and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochemistry* **44**, 847–852 (1997).
38. Osorio-Esquivel, O., Alicia-Ortiz-Moreno, Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L. & Giusti, M. M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Res. Int.* **44**, 2160–2168 (2011).
39. Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P. & Mizrahi, Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry* **68**, 251–259 (2007).
40. Wybraniec, S. & Mizrahi, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus* cacti. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6086–6089 (2002).
41. Kugler, F., Stintzing, F. C. & Carle, R. Identification of Betalains from Petioles of Differently Colored Swiss Chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2975–2981 (2004).
42. Masson S, L., Salvatierra, M. A., Robert C, P., Encina A, C. & Camilo M, C. Chemical and Nutritional Composition of Copao Fruit (*Eulychnia acida* Phil.) Unswete Thee Environmental Conditions in the Coquimbo Region. *Chil. J. Agric. Res.* **71**, 521–529 (2011).
43. Khan, M. I., Sri Harsha, P. S. C., Giridhar, P. & Ravishankar, G. A. Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and in vitro cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains. *LWT - Food Sci. Technol.* **47**, 315–323 (2012).
44. Amin, I., Norazaidah, Y. & Hainida, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chem.* **94**, 47–52 (2006).
45. Chon, S. U., Heo, B. G., Park, Y. S., Kim, D. K. & Gorinstein, S. Total phenolics level, antioxidant activities and cytotoxicity of young sprouts of some traditional Korean salad plants. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**, 25–31 (2009).
46. Musso, H. The pigments of fly agaric, *Amanita muscaria*. *Tetrahedron* **35**, 2843–2853

- (1979).
47. Michelot, D. & Melendez-Howell, L. M. *Amanita muscaria*: Chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research* **107**, 131–146 (2003).
 48. Gandía-Herrero, F., Simón-Carrillo, A., Escribano, J. & García-Carmona, F. Determination of beet root betanin in dairy products by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Chem. Educ.* **89**, 660–664 (2012).
 49. Junqueira-Goncalves, M. P. *et al.* Irradiated beetroot extract as a colorant for cream cheese. *Radiat. Phys. Chem.* **80**, 114–118 (2011).
 50. Prudencio, I. D., Prudêncio, E. S., Gris, E. F., Tomazi, T. & Bordignon-Luiz, M. T. Petit suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. *LWT - Food Sci. Technol.* **41**, 905–910 (2008).
 51. Martínez, L., Cilla, I., Beltrán, J. A. & Roncalés, P. Comparative effect of red yeast rice (*Monascus purpureus*), red beet root (*Beta vulgaris*) and betanin (E-162) on colour and consumer acceptability of fresh pork sausages packaged in a modified atmosphere. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 500–508 (2006).
 52. Pedreño, M. A. & Escribano, J. Correlation between antiradical activity and stability of betanin from *Beta vulgaris* L roots under different pH, temperature and light conditions. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 627–631 (2001).
 53. Escribano, J., Pedreño, M. A., García-Carmona, F. & Muñoz, R. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.* **9**, 124–127 (1998).
 54. Cai, Y., Sun, M. & Corke, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2288–2294 (2003).
 55. Sreekanth, D. *et al.* Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine* **14**, 739–746 (2007).
 56. Wu, L. C. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* **95**, 319–327 (2006).
 57. Kapadia, G. J. *et al.* Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol. Res.* **47**, 141–148 (2003).
 58. Kapadia, G. J., Tokuda, H., Konoshima, T. & Nishino, H. Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Lett.* **100**, 211–214 (1996).
 59. Lechner, J. F. *et al.* Drinking Water with Red Beetroot Food Color Antagonizes Esophageal Carcinogenesis in *N*-Nitrosomethylbenzylamine-Treated Rats. *J. Med. Food* **13**, 733–739 (2010).
 60. Luisa Tesoriere, Daniela Butera, Mario Allegra, Marco Fazzari, and Livrea*, M. A. Distribution of Betalain Pigments in Red Blood Cells after Consumption of Cactus Pear

- Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. (2005). doi:10.1021/JF048134+
61. Kanner, J., Harel, S. & Granit, R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5178–5185 (2001).
 62. Tesoriere, L. *et al.* Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic. Res.* **37**, 689–696 (2003).
 63. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999).
 64. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25–30 (1995).
 65. Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619–4626 (2001).
 66. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
 67. Esposito, B. P. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* **102**, 2670–2677 (2003).
 68. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Biological Activities of Plant Pigments Betalains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 937–945 (2016).
 69. Pavlov, A., Kovatcheva, P., C, V. G.-... für N. & 2002, undefined. Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *degruyter.com*
 70. Butera, D. *et al.* Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6895–6901 (2002).
 71. Cai, Y. Z., Mei Sun, Jie Xing, Luo, Q. & Corke, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* **78**, 2872–2888 (2006).
 72. Gonçalves, L. C. P., Di Genova, B. M., Dörr, F. A., Pinto, E. & Bastos, E. L. Effect of dielectric microwave heating on the color and antiradical capacity of betanin. *J. Food Eng.* **118**, 49–55 (2013).
 73. Azeredo, H. M. C. Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2365–2376 (2009).
 74. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Betalain Stability and Degradation Structural and Chromatic Aspects. *J. Food Sci.* **71**, R41–R50 (2006).
 75. Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B. & Rimbach, G. Betanin-A food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 36–47 (2015).

76. Pasch, J. H. & Elbe, J. H. Betanine Degradation As Influenced By Water Activity. *J. Food Sci.* **40**, 1145–1147 (1975).
77. Cohen, E. & Saguy, I. Effect of Water Activity and Moisture Content on the Stability of Beet Powder Pigments. *J. Food Sci.* **48**, 703–707 (1983).
78. Saguy, I., Kopelman¹, I. J. & Mizrahi, S. Thermal Kinetic Degradation of Betanin and Betalamic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 360–362 (1978).
79. Huang, A. S. & Elbe, J. H. Von. Kinetics of the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* **50**, 1115–1120 (1985).
80. Elbe, J. H., Schwartz, S. J. & Hildenbrand, B. E. Loss and Regeneration of Betacyanin Pigments During Processing of Red Beets. *J. Food Sci.* **46**, 1713–1715 (1981).
81. Elbe, J. H., Maing, I.-Y. & Amundson, C. H. Color Stability of Betanin. *J. Food Sci.* **39**, 334–337 (1974).
82. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations. *J. Food Sci.* **69**, C491–C498 (2006).
83. Saguy, I. Thermostability of Red Beet Pigments (Betanine And Vulgaxanthin?I): Influence of Ph And Temperature. *J. Food Sci.* **44**, 1554–1555 (1979).
84. Bartoloni, F. H. *et al.* Photophysics and hydrolytic stability of betalains in aqueous trifluoroethanol. *Monatshefte fur Chemie* **144**, 567–571 (2013).
85. HUANG, A. S. & ELBE, J. H. VON. Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* **52**, 1689–1693 (1987).
86. Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W. & Corke, H. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4429–4435 (2001).
87. Schwartz, S. J. & von Elbe, J. H. Identification of betanin degradation products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **176**, 448–453 (1983).
88. Esteves, L. C. *et al.* Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochem. Photobiol.* **94**, 853–864 (2018).
89. Sollenberger, P. Y. & Martin, R. B. Carbon-nitrogen and nitrogen-nitrogen double bond condensation reactions. in *The Amino Group (1968)* 349–406 (John Wiley & Sons, Ltd., 2010). doi:10.1002/9780470771082.ch7
90. Strack, D. & Wray, V. Recent Advances in Betalain Analysis. in *Caryophyllales* 263–277 (Springer Berlin Heidelberg, 1994). doi:10.1007/978-3-642-78220-6_12
91. Wybraniec, S. Formation of decarboxylated betacyanins in heated purified betacyanin fractions from red beet root (*Beta vulgaris* L.) monitored by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3483–3487 (2005).
92. Herbach, M. K., Stintzing, F. C. & Carle, R. Thermal degradation of betacyanins in juices

- from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. in *European Food Research and Technology* **219**, 377–385 (Springer, 2004).
93. Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phylloactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2603–2616 (2005).
 94. Tzin, V. & Galili, G. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. B.* **8**, e0132 (2010).
 95. Herrmann, K. M. *The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. The Plant Cell* **7**, (American Society of Plant Physiologists, 1995).
 96. Steglich, W. & Strack, D. Betalains. *Alkaloids Chem. Pharmacol.* **39**, 1–62 (1990).
 97. Newman, T. *et al.* Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**, 1241–1255 (1994).
 98. Girod, P. A. & Zryd, J. P. Biogenesis of betalains: Purification and partial characterization of dopa 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry* **30**, 169–174 (1991).
 99. Schliemann, W., Kobayashi, N. & Strack, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* **119**, 1217–1232 (1999).
 100. Strack, D., Vogt, T. & Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**, 247–269 (2003).
 101. Sasaki, N. *et al.* Isolation and Characterization of cDNAs Encoding an Enzyme with Glucosyltransferase Activity for cyclo-DOPA from Four O’clocks and Feather Cockscombs. *Plant Cell Physiol.* **46**, 666–670 (2005).
 102. Sasaki, N., Adachi, T., Koda, T. & Ozeki, Y. Detection of UDP-glucose: cyclo -DOPA 5-*O* -glucosyltransferase activity in four o’clocks (*Mirabilis jalapa* L.). *FEBS Lett.* **568**, 159–162 (2004).
 103. Chen, B. *et al.* Functional MRI of human pancreas using BOLD contrast: Responses following glucose ingestion. *J. Magn. Reson. Imaging* **46**, 831–836 (2017).
 104. Deloache, W. C. *et al.* An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 465–471 (2015).
 105. Grotewold, E. THE GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF FLORAL PIGMENTS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 761–780 (2006).
 106. Polturak, G. & Aharoni, A. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant* **11**, 7–22 (2018).
 107. Zhang, Q., Pan, J., Wang, Y., Lubet, R. & You, M. Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Mol. Carcinog.* **52**, 686–691 (2013).

108. Reddy, K. O. *et al.* Extraction and characterization of cellulose single fibers from native african napier grass. *Carbohydr. Polym.* **188**, 85–91 (2018).
109. Nowacki, L. *et al.* Betanin-Enriched Red Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extract Induces Apoptosis and Autophagic Cell Death in MCF-7 Cells. *Phyther. Res.* **29**, 1964–1973 (2015).
110. Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C. & Livrea, M. A. Phytochemical indicaxanthin suppresses 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis by preventing cytosolic Ca²⁺ increase and oxidative stress. *Br. J. Nutr.* **110**, 230–240 (2013).
111. Naselli, F. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 652–658 (2014).
112. Livrea, C. G. L. T. M. A. M. A. & D'alessio, P. Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 481–486 (2004).
113. Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H. & Baer-Dubowska, W. Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *Br. J. Nutr.* **110**, 2138–2149 (2013).
114. Esatbeyoglu, T. *et al.* Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food Chem. Toxicol.* **73**, 119–126 (2014).
115. Gonçalves, L. C. P. *et al.* A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.* **131**, 231–238 (2012).
116. Nakashima, K. K. & Bastos, E. L. Rationale on the High Radical Scavenging Capacity of Betalains. *Antioxidants* **8**, 222 (2019).
117. Bickmeyer, U. The alkaloid Ageladine A, originally isolated from marine sponges, used for pH-sensitive imaging of transparent marine animals. *Mar. Drugs* **10**, 223–33 (2012).
118. Goswami, D., Machini, M. T., Silvestre, D. M., Nomura, C. S. & Esposito, B. P. Cell penetrating peptide (CPP)-conjugated desferrioxamine for enhanced neuroprotection: synthesis and in vitro evaluation. *Bioconjug. Chem.* **25**, 2067–80 (2014).
119. Daniele, S. *et al.* Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells. *Sci. Rep.* **5**, 9956 (2015).
120. Okamoto, A. *et al.* The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. *BMC Anesthesiol.* **16**, 1–12 (2016).
121. Ferreira, C. P. Percepção Ambiental na Estação Ecológica de Jureia - Itatins. (Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2005). doi:10.11606/D.90.2005.tde-01122008-154923

122. Ortega, P. *et al.* Physiological differences in the crab *Ucides cordatus* from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* **36**, (2017).
123. Smith, S. I. Notice of the Crustacea collected by Prof. C.F. Hartt on the coast of Brazil in 1867. *Trans. Connect. Acad. Arts Sci.* **2**, 1–42 (1869).
124. Superintendência de Recursos Humanos da Educação (Brasil). *PORTARIA SUDEPE N° N-24, 26 DE JULHO DE 1983*. DOU 01/08/1983 (1983).
125. ICMBio. DOU 13/04/2018. *Diário Of. da União Seção 1*, 84 (2018).
126. Rojas, A. C. Método: Gel de electroforesis Agarosa. *Conogasi* 1 (2017). Available at: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>. (Accessed: 11th April 2020)
127. Trezzini, G. F. & Zrýd, J. P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. *Phytochemistry* **30**, 1897–1899 (1991).
128. Bilyk, A. & Howard, M. Reversibility of Thermal Degradation of Betacyanines under the Influence of Isoascorbic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 906–908 (1982).
129. von Elbe, J. H. Measurement of Discoloration In Fresh Meat. in *Handbook of Food Analytical Chemistry* (ed. Wrolstad) **2–2**, 123–129 (John Wiley and Sons Ltd., 2005).
130. Elbe, J. Von & Maing, I. Y. Betalains as possible food colorants of meat substitutes. *Cereal Sciecen Today* (1973).
131. Albert, A., Serjeant, E. P., Albert, A. & Serjeant, E. P. Determination of ionization constants by Potentiometric titration using a glass electrode. in *The Determination of Ionization Constants* 14–38 (Springer Netherlands, 1984). doi:10.1007/978-94-009-5548-6_2
132. Nilsson, T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshogskolans Ann.* **36**, 179–219 (1970).
133. Clement, J. S., Mabry, T. J., Wyler, H. & Dreiding, A. S. Chemical Review and Evolutionary Significance of the Betalains. in *Caryophyllales* 247–261 (Springer Berlin Heidelberg, 1994). doi:10.1007/978-3-642-78220-6_11
134. Schmidt, O. T., Becher, P. & Hübner, M. Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe, III. *Chem. Ber.* **93**, 1296–1304 (1960).
135. Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V. & Soares, H. M. V. M. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. *RSC Advances* **5**, 30989–31003 (2015).
136. Escribano Cebrián, J., García Carmona, F. y & Gandía Herrero, F. Procedure for obtaining betalamic acid and use of it. 22 (2009).
137. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. & Wothers, P. *Organic chemistry*. (Oxford University Press, 2012).
138. Novak, M. *et al.* Hydrolysis of N-Acetyl-p-benzoquinone Imines: Ph Dependence of the

- Partitioning of a Tetrahedral Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4447–4456 (1989).
139. Choo, K. Y., Ong, Y. Y., Lim, R. L. H., Tan, C. P. & Ho, C. W. Study on bioaccessibility of betacyanins from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 1163–1169 (2019).
 140. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J. Nat. Prod.* **72**, 1142–1146 (2009).
 141. Wybraniec, S. *et al.* Studies on nonenzymatic oxidation mechanisms in neobetanin, betanin, and decarboxylated betanins. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6465–6476 (2013).
 142. Di Meo, F. *et al.* Free radical scavenging by natural polyphenols: Atom versus electron transfer. *J. Phys. Chem. A* **117**, 2082–2092 (2013).
 143. Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* **613**, 1–19 (2008).
 144. Gandía-Herrero, F., Escribano, J. & García-Carmona, F. Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod.* **75**, 1030–1036 (2012).
 145. Pavliuk, M. V. *et al.* Nano-hybrid plasmonic photocatalyst for hydrogen production at 20% efficiency. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
 146. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O. & Sivas, H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* 271–297 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8
 147. Malich, G., Markovic, B. & Winder, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* **124**, 179–192 (1997).
 148. Casse, F., Boucher, C. & Julliot, J. S. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose Gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 229–242 (1979).
 149. Kwietny, H., Levin, G., Bergmann, F. & Brown, D. J. Mechanism of enzymatic oxidation of purines. *Science (80-)*. **130**, 711–712 (1959).
 150. Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67–75 (1984).
 151. Bikos, D. A. & Mason, T. G. Band-collision gel electrophoresis. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
 152. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J. Vis. Exp.* e3923 (2012). doi:10.3791/3923
 153. Sun, Y. L., Xu, Y. Z. & Chambon, P. A simple and efficient method for the separation and detection of small DNA fragments by electrophoresis in formamide containing agarose gels

- and Southern blotting to DBM-paper. *Nucleic Acids Res.* **10**, 5753–5763 (1982).
154. Kotlyar, S., Weihrauch, D., Paulsen, R. S. & Towle, D. W. Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.* **203**, (2000).
 155. Makovets, S. *DNA Electrophoresis. Methods in Molecular Biology* (Springer Protocols, 2003).
 156. Hellman, L. M. & Fried, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* **2**, 1849–1861 (2007).
 157. Serrano, L. *et al.* Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J. Exp. Biol.* **206**, 979–988 (2003).
 158. Zmora, N., Trant, J., Chan, S.-M. & Chung, J. S. Vitellogenin and Its Messenger RNA During Ovarian Development in the Female Blue Crab, *Callinectes sapidus*: Gene Expression, Synthesis, Transport, and Cleavage. *Biol. Reprod.* **77**, 138–146 (2007).
 159. Weng, M. wen *et al.* Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E6152–E6161 (2018).
 160. Voulgaridou, G. P., Anestopoulos, I., Franco, R., Panayiotidis, M. I. & Pappa, A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **711**, 13–27 (2011).
 161. Lopachin, R. M. & Gavin, T. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective. *Chemical Research in Toxicology* **27**, 1081–1091 (2014).
 162. Shishodia, S. *et al.* NMR analyses on N-hydroxymethylated nucleobases-implications for formaldehyde toxicity and nucleic acid demethylases. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 4021–4032 (2018).
 163. Rohr, E. L. & Kaffenberger, W. Fluorescence instability of propidium iodide-labelled microspheres in (para)formaldehyde. *Cytometry* **14**, 584–586 (1993).
 164. Tirzitis, G. & Bartosz, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 139–142 (2010).
 165. Halliwell, B. & Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press (1999).
 166. Azzi, A., Davies, K. J. A. & Kelly, F. Free radical biology - Terminology and critical thinking. *FEBS Letters* **558**, 3–6 (2004).
 167. Tzin, V., Galili, G. & Aharoni, A. Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis. in *eLS* 1–10 (John Wiley & Sons, Ltd, 2012). doi:10.1002/9780470015902.a0001315.pub2
 168. Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 473–503 (1999).

169. Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. & Fernie, A. R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science* **4**, (2013).
170. Trezzini, G. F. & Zryb, J. P. Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry* **30**, 1901–1903 (1991).
171. Mattioli, R. R. Efeito da N-metilação sobre a estabilidade hidrolítica e fluorescência de sondas betalaínicas. (Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2018). doi:10.11606/D.46.2019.tde-08022019-100057
172. Büchi, G., Fliri, H. & Shapiro, R. A Synthesis of Betalamic Acid. *Journal of Organic Chemistry* **42**, 2192–2194 (1977).
173. Schaich, K. M., Tian, X. & Xie, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* **14**, 111–125 (2015).
174. Vaquero, C. G. P. Influência de etossulfato de fenazina na produção in vitro de embriões bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do triacilglicerol. (Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2015). doi:10.11606/D.74.2015.tde-05102015-092328

7. ANEXOS. MATERIAL SUPLEMENTARIO

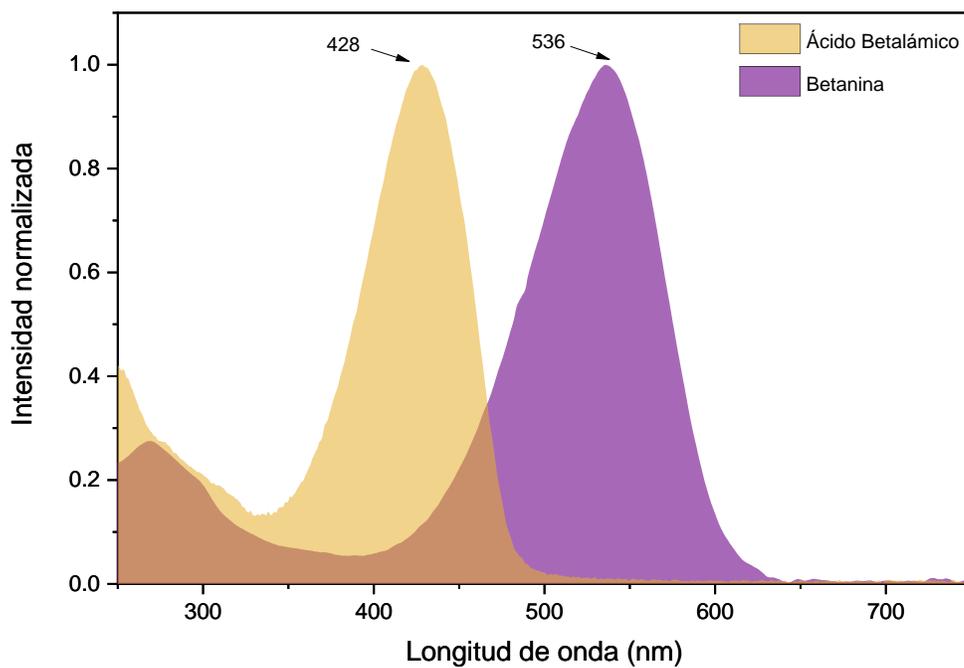


Figura S1. Espectros de absorción del ácido betalámico (amarillo), y la betanina (morado). $\lambda_{HBt}^{abs} = 428$ nm, $\lambda_{Bn}^{abs} = 536$ nm en pH = 7.0, T = 25 °C.

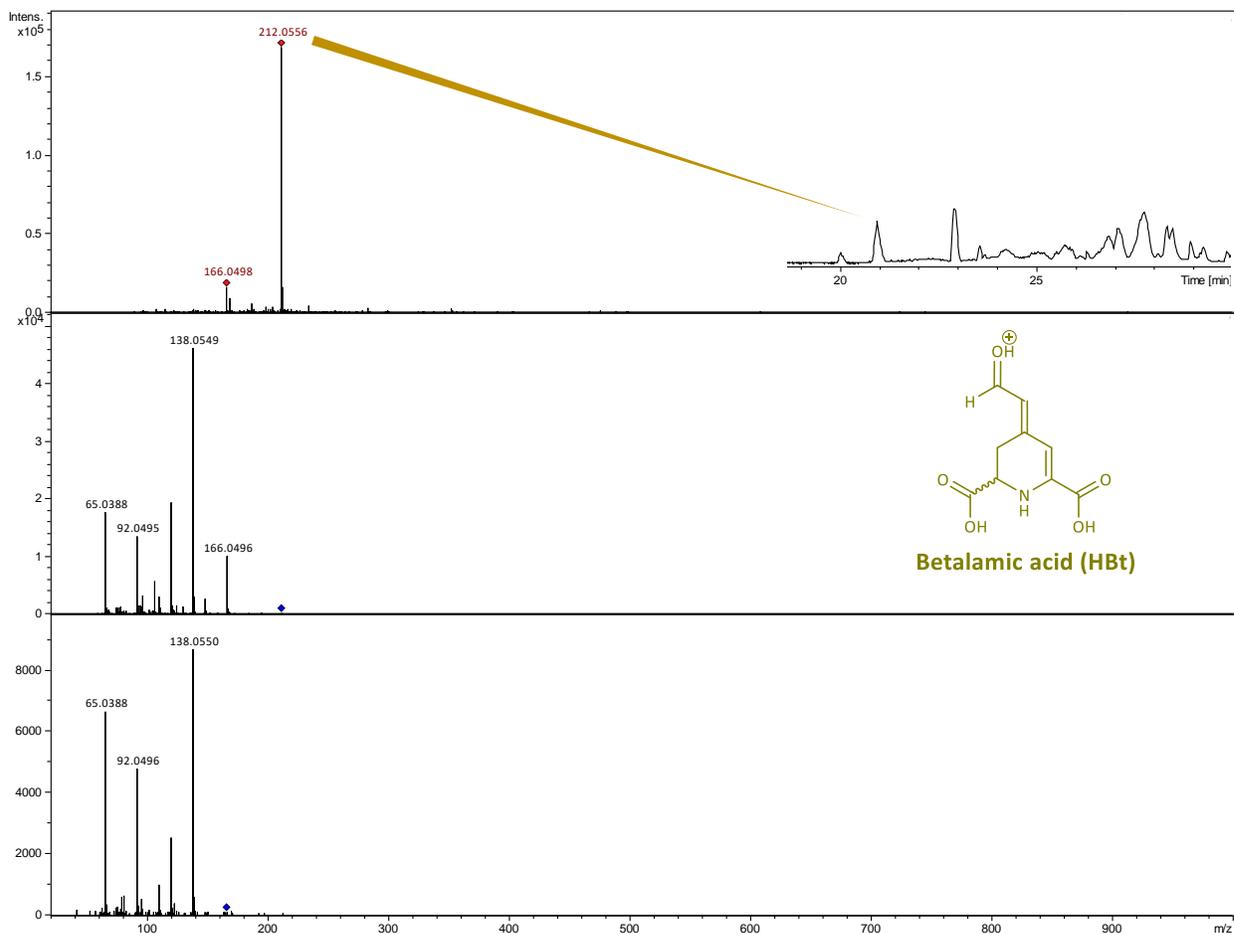


Figura S2. Cromatograma del **HBt** acompañado por UV-vis en 254 nm (columna de fase reversa C18, 250 × 4.6 mm; sistema cromatográfico: 5 – 95% en 30 min, siendo el solvente A: 0.05% HCO₂H/agua y solvente B: 0.05% HCO₂H/MeCN), y espectrograma de HPLC-DAD-MS/MS(ESI+) del pico en $t_R = 21$ min con $m/z = 212.0556$ (M-H)⁺.

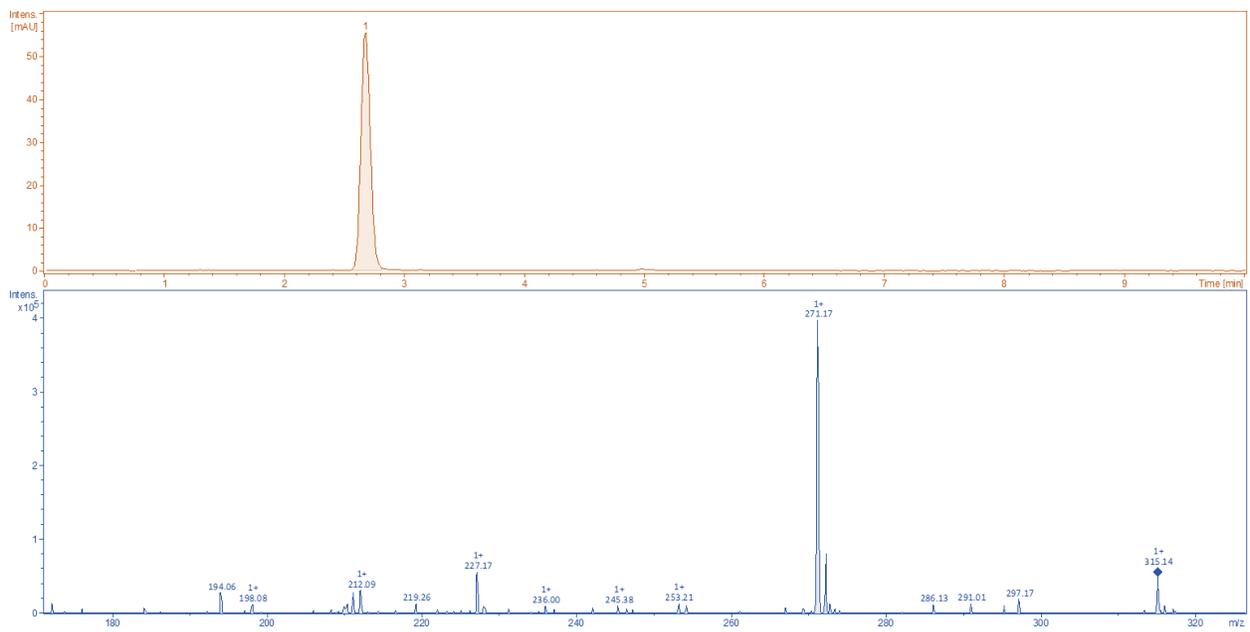


Figura S3. Cromatograma y espectro de masas del BeetTris en H₂O.

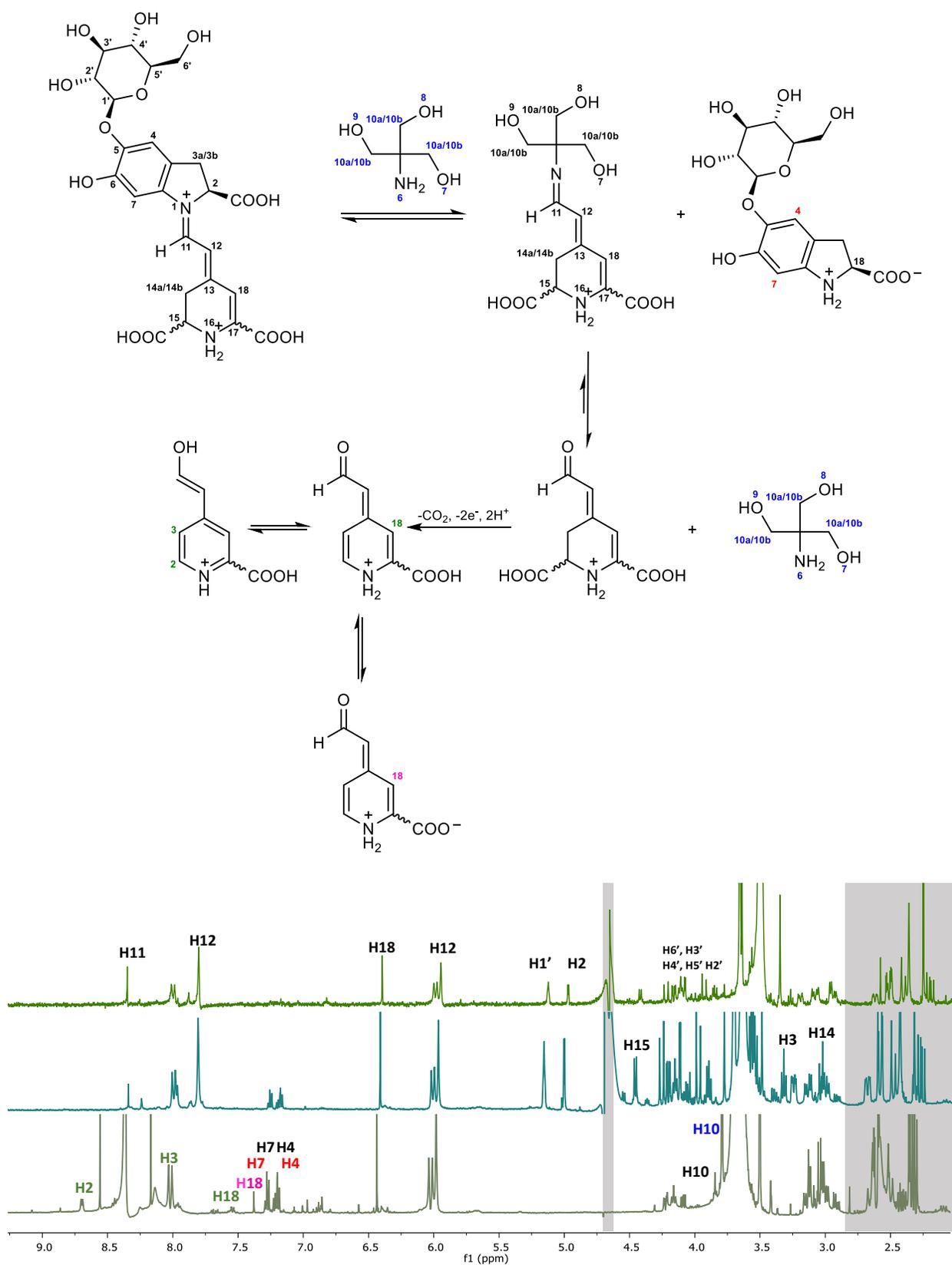


Figura S4. Identificación de las betalainas (Bn y BeetTris). RMN¹H del sistema BeetTris en D₂O.

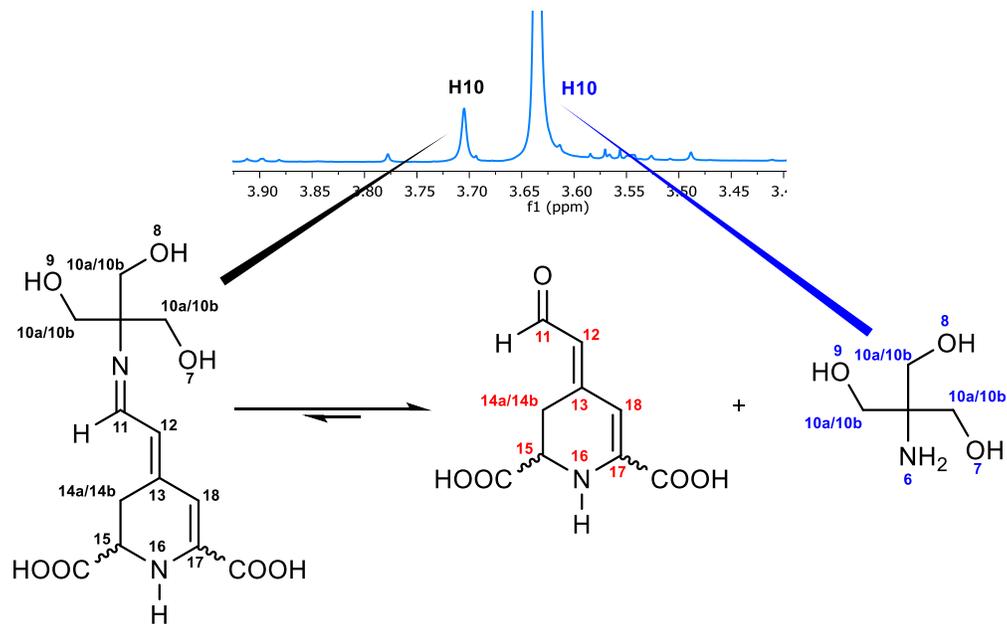


Figura S5. Identificación de la hidrólisis de la betaxantina artificial. RMN¹H del sistema BeetTris en D₂O.

```

Control ----- 0
Bnpos ----- 0
Bttrispres ----- 0
AF233355.1 GAGGCCTACACCCTCTTCGCCCTCTGTTTCGACCCATCATCGAGGACTACCACAAGGGT 300
Bnpres ----- 0
Bttrispres ----- 0

Control ----- 0
Bnpos -----GACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC 30
Bttrispres -----GACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC 30
AF233355.1 TTCAAGCAGACTGACAAGCACCCCTAACAGGACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC 360
Bnpres -----GACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC 30
Bttrispres -----GACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC 30

Control -----TTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 42
Bnpos GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 90
Bttrispres GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 90
AF233355.1 GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 420
Bnpres GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 90
Bttrispres GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTGCGTTGCGGTGCTCCATGGAG 90
*****

Control GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 102
Bnpos GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 150
Bttrispres GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 150
AF233355.1 GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 480
Bnpres GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 150
Bttrispres GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTT 150
*****

```

```

Control      TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC 162
Bnpos       TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCCTCACCGGC 210
Bttrispre   TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCCTCACCGGC 210
AF233355.1  TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC 540
Bnpre       TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC 210
Bttrispos   TCCTCCACCTGTCCAACCTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC 210
*****

Control      ATGACCAAGGATGTGCAGCAGAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 222
Bnpos       ATGACCAAGGATGTGCAGCAGAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 270
Bttrispre   ATGACCAAGGATGTGCAGCAGAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 270
AF233355.1  ATGACCAAGGAGTGCAGCAAAAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 600
Bnpre       ATGACCAAGGAGTGCAGCAGAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 270
Bttrispos   ATGACCAAGGAGTGCAGCAGAAGCTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGAC 270
*****

Control      CGCTTCCTGCAGGCCGCTAATGCCTGCCGCTACTGGCCCACTGGCCGTGGCATCTACCAC 282
Bnpos       CGCTTCCTGCAGGCC----- 285
Bttrispre   CGCTTCCTGCAGGCC----- 285
AF233355.1  CGCTTCCTGCAGGCCGCTAATGCCTGCCGCTACTGGCCCACTGGCCGTGGCATCTACCAC 660
Bnpre       CGCTTCCTGCAGGCCGCTAATGCCTGCCGCT----- 301
Bttrispos   CGCTTCCTGCAGGCCGCTAATGCCTGCCGCTAC----- 303
*****

Control      AACGACAACAAGACCTCCCTGGTGTGG----- 309
Bnpos       ----- 285
Bttrispre   ----- 285
AF233355.1  AACGACAACAAGACCTCCCTGGTGTGGTCAACGAAGAGGATCACCTCCGCATCATCTCC 720
Bnpre       ----- 301
Bttrispos   ----- 303

Control      -----FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 44
AF233355.1  DFGDVNQFVNVDPDGK FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 60
Bttrispos   DFGDVNQFVNVDPDGK FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 60
Bnpre       DFGDVNQFVNVDPDGK FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 60
Bnpos       DFGDVNQFVNVDPDGK FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 60
Bttrispre   DFGDVNQFVNVDPDGK FVISTRVRCGRSMEGYPFNPCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGE 60
*****

Control      LKGTYPFLTGMTKDVQQKLIDHFLFKEGDRFLQAAANACRYWPTGRGIYHNDNKTSLVW 103
AF233355.1  LKGTYPFLTGMTKEVQQKLIDHFLFKEGDRFLQAAANACRY----- 101
Bttrispos   LKGTYPFLTGMTKEVQQKLIDHFLFKEGDRFLQAAANACRY----- 101
Bnpre       LKGTYPFLTGMTKEVQQKLIDHFLFKEGDRFLQAAANACRY----- 101
Bnpos       LKGTYPFLTGMTKDVQQKLIDHFLFKEGDRFLQA----- 95
Bttrispre   LKGTYPFLTGMTKDVQQKLIDHFLFKEGDRFLQA----- 95

```

Figura S6. Alineamiento de nucleótidos y de aminoácidos. Control: secuenciamiento (*forward*) parcial del ADNc de arginina quinase del pedúnculo ocular de la especie de cangrejo *Callinectes danae*. AF233355.1: secuenciamiento de ADNc de arginina quinase de la especie de cangrejo *Callinectes sapidus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF233355.1>). Bnpos: ADNc amplificado (PCR) con adición de Bn después del ensayo de amplificación por PCR. Bttrispos: ADNc amplificado (PCR) con adición de BeetTris después del ensayo de amplificación por PCR. Bnpre: Amplificación del ADNc en presencia de la Bn. Bttrispre: Amplificación del ADNc en presencia de la BeetTris. El análisis de identidad de los nucleótidos fue realizado usando el programa BioEdit versión 7.2.5 (<http://bioedit.software.informer.com/>) y Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El “*” significa la semejanza en los pares de bases o aminoácidos.