

LEANDRO DE OLIVEIRA RODRIGUES ARRIVETTI

Aspectos da reatividade de vitaminas do complexo B frente ao estado  
tripleto excitado de flavinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2012

Aos meus pais, família e amigos que sempre me apoiaram com muito amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Edson e Fátima, a minha irmã Jaqueline, aos meus avós, tios, tias, primos e toda a minha família por apoiarem e acreditarem em mim durante todo o tempo de meus estudos.

Ao meu orientador prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso, pela confiança e dedicação.

À profa. Dra. Carla C. S. Cavalheiro pela estrutura fornecida.

Aos amigos do Laboratório da Química da Aguardente e da Inorgânica do IQSC-USP, Regina, Bezerra, Ju, Silmara, Flávia, Ana, Balinha, Itapira, Felipão, Aline, Lina, Carlão, Japonês, Andressa, Natália, Silvia, Naná, Barbie, Tiagão, Danizinha, Camila, Aline Tavares, Dani Truzzi, Willy, Augusto, Maicon, Gustavo, Marcela, Larissa, Tiaguinho, Henrique, Evânia, Gabi, Marianne e todos os amigos que me ajudaram durante este período.

Aos amigos da República Voadores Albiere, Allan, Bixão, Bronha, Dú, Ituverava, Leitoso, Luiz, Marisco, Moita, Pirikito, Rolinha, Tiago, Turni, Vitão, Vô e Zá que dividiram esses bons momentos.

Aos amigos Igor, João, Mari, Vivi, Vagner, Luana, Ju, Pino, Perereca, Jeca, Maradona, Beck, Tony, Zé, Gustavão, Galinhão, Gabi, Pati, Daia, Mah, Paula e Carol.

Aos amigos de Mogi Cris, Lu, Pé, Rê, Furlan, Mucho, Kenji, Fábio, Glub, Anny, Mauricio.

Aos funcionários do IQSC-USP por estarem prontos a ajudar, em especial as secretárias Veroneide, Silvia e Andreia.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

*“Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade”*

*Carlos Drummond de Andrade*

## RESUMO

Dentre os diversos fatores responsáveis pela instabilidade química das vitaminas nos alimentos, a exposição à radiação luminosa é determinante, principalmente em alimentos contendo vitamina B2. O presente trabalho investigou a degradação fotossensibilizada das vitaminas do complexo B (ácido fólico, piridoxal, biotina e niacina) por flavinas. O piridoxal-5'-fosfato (PLP) mostrou-se reativo frente aos estados singlete e tripleto excitado das flavinas com constante de desativação de  $1,03 \cdot 10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para o estado singlete, valor este superior ao valor esperado para reações bimoleculares controladas por difusão em meio aquoso. Foi observada uma dependência significativa da constante de velocidade de desativação do estado singlete excitado com a temperatura, onde o aumento da temperatura proporciona um decréscimo da constante de velocidade sugerindo a existência de um complexo [FMN...PLP] no estado fundamental o qual foi confirmado por espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. O PLP mostrou-se reativo frente ao estado tripleto excitado da FMN com constante de velocidade de  ${}^3k_q = 3,0 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  em meio de tampão fosfato pH 6,4 ou em meio de óxido de deutério a 25 °C. Não foi observada diferença significativa entre as constantes de desativação do estado tripleto excitado em meio aquoso e de óxido de deutério o que corrobora com um processo direto de transferência de elétrons do PLP para a  ${}^3\text{FMN}^*$  ao invés de um processo de transferência de átomo de hidrogênio. As vitaminas (biotina e niacina) mostraram-se não reativas frente aos estados singlete e tripleto excitados da vitamina B2 o que pode ser atribuído aos altos potenciais de oxidação,  $E^\circ > 2 \text{ V vs. NHE}$ , observados para estas vitaminas em meio aquoso. A voltametria cíclica do PLP apresentou um processo anódico e irreversível ( $E = 1,07 \text{ V vs. NHE}$ ), controlada cineticamente por transferência de elétrons heterogênea do PLP para o eletrodo. O rendimento quântico de fotodegradação do PLP em meio aquoso e aerado é 2,5 vezes superior ao encontrado para a reação em meio anaeróbico, o que sugere a participação do íon superóxido no processo global de degradação do PLP. O ácido fólico demonstrou-se igualmente reativo frente ao estado tripleto excitado das flavinas ( ${}^3k_q = 4,8 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $\Phi = 0,26$  (meio aerado) e  $\Phi = 0,32$  (meio anaeróbico)) e a sua complexação pela  $\beta$ -LG ( $\Phi = 0,032$  (meio aerado) e  $\Phi = 0,055$

(meio anaeróbico)) uma eficiente abordagem na proteção desta vitamina frente a fotodegradação sensibilizada por flavinas.

## ABSTRACT

Among several factors responsible for the chemical instability of vitamins in food, exposure to light radiation is decisive, especially in supplemented or fortified food with vitamin B2. This study investigated the photosensitized degradation of B-vitamins (folic acid, pyridoxal, biotin and niacin) by flavins. The pyridoxal-5'-phosphate (PLP) reacted with singlet and triplet excited states of flavins with rate constant for quenching of  $^1k_q = 1,03 \cdot 10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the singlet state, this value is higher than expected value of bimolecular reactions controlled by diffusion in an aqueous solvent. A significant dependence was observed for the rate constant for deactivation of singlet excited state with temperature, the increase of the temperature leads to a decrease of the rate constant suggesting the existence of a complex [FMN $\cdots$ PLP] in ground state confirmed by time resolved fluorescence spectroscopy. PLP reacted with FMN triplet excited state with rate constant  $^3k_q = 2,96 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in phosphate buffer pH 6,4 or deuterium oxide at 25 °C. There was no significant difference between the rate constant of deactivation of the triplet-excited of FMN in aqueous solution or deuterium oxide which confirms a direct process of electron transfer to PLP for  $^3\text{FMN}^*$  rather than a process of transfer of hydrogen atom. Biotin and niacin unreacted with singlet and triplet excited states of vitamin B2 which can be attributed to high oxidation potentials,  $E^\circ > 2 \text{ V vs. NHE}$ , observed for this vitamins in aqueous solution. The cyclic voltammetry of PLP had an irreversible anodic oxidation process ( $E = 1.07 \text{ V vs. NHE}$ ) kinetically controlled by heterogeneous electron transfer from PLP to the electrode. The quantum yield of photodegradation of PLP in aerobic condition is 2.5 times higher than that found for the reaction in anaerobic condition, which suggests the of participation of superoxide ion in the PLP global degradation process. Folic acid demonstrated reactive with triplet excited state of flavins ( $^3k_q = 4,8 \cdot 10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $\Phi = 0,26$  (aerobic condition) and  $\Phi = 0,32$  (anaerobic condition)) and the complexation with  $\beta$ -LG ( $\Phi = 0,032$  (aerobic condition) and  $\Phi = 0,055$  anaerobic condition)) an efficient approach in protecting the vitamin against photodegradation sensitized by flavins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da riboflavina, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e lumiflavina. ....	18
<b>Figura 2</b> - Estrutura química dos poliglutamatos de folato. ....	20
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do piridoxal, piridoxal-5'-fosfato, piridoxamina e da piridoxina. ....	21
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da biotina. ....	23
<b>Figura 5</b> - Estrutura química da niacina: ácido nicotínico e nicotinamida. ....	25
<b>Figura 6</b> - Estrutura cristalográfica da $\beta$ -LG a pH 7,1. ....	26
<b>Figura 7</b> - Diagrama de Jablonski; $S_0$ = estado fundamental; $S_1$ = primeiro estado excitado singleto; $S_2$ = segundo estado excitado singleto; $T_2$ = segundo estado excitado tripleto; $T_1$ = primeiro estado excitado tripleto; $k_{ISC}$ = constante cruzamento intersistemas = $2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ; $k_f$ = constante de fluorescência = $5,4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ . ....	27
<b>Figura 8</b> - Formação do estado tripleto excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa (440 nm). ....	28
<b>Figura 9</b> - Ciclo termodinâmico de processos de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina com substrato por transferência de elétron (ET), transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e transferência de elétron acoplada a próton (PCET). ....	29
<b>Figura 10</b> - Esquema do mecanismo de fotooxidação do Tipo I e Tipo II. ....	30
<b>Figura 11</b> - Bancada fotoquímica Oriol. (1) Lâmpada de Hg, (2) Filtro de calor, (3) Janela, (4) Lente de foco, (5) Filtro de Interferência (440 nm), (6) Porta amostra. ....	35
<b>Figura 12</b> - Espectro eletrônico da absorvidade molar da FMN $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa tampão fosfato pH 6,4 e força iônica de 0,16 M. ....	41
<b>Figura 13</b> - Espectro eletrônico da $\Delta$ Absorbância do estado tripleto excitado da FMN $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ (T-T) registrado 0,8 $\mu\text{s}$ , 5,8 $\mu\text{s}$ , 15,8 $\mu\text{s}$ e 77,0 $\mu\text{s}$ após o pulso de laser de 355 nm com energia $\approx 14 \text{ mJ/cm}^2$ . ....	42
<b>Figura 14</b> - Espectro eletrônico da $\Delta$ Absorbância do estado tripleto excitado da FMN $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença do supressor PLP $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (T-T) registrado 0,8 $\mu\text{s}$ , 5,8 $\mu\text{s}$ , 15,8 $\mu\text{s}$ e 77,0 $\mu\text{s}$ após o pulso de laser de 355 nm com energia $\approx 14 \text{ mJ/cm}^2$ . ....	43
<b>Figura 15</b> - Curvas de decaimento do estado tripleto excitado da FMN em função da concentração do supressor PLP. Solução aquosa de tampão fosfato $20 \text{ mmol L}^{-1}$ saturada com $\text{N}_2$ e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FMN. ....	44
<b>Figura 16</b> - Gráfico de $k_{\text{obs}}$ versus [PLP] em solução aquosa de tampão fosfato $20 \text{ mmol L}^{-1}$ saturada com $\text{N}_2$ e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FMN. ....	45
<b>Figura 17</b> - Gráfico de $k_{\text{obs}}$ versus [PLP] em solução de tampão fosfato deuterado $20 \text{ mmol L}^{-1}$ saturada com $\text{N}_2$ e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FMN. ....	45
<b>Figura 18</b> - Figuras A, B, C, D e E ilustram o espectro de emissão de fluorescência de uma solução aquosa de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FMN na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato com pH 5,0 a $25^\circ\text{C}$ , pH 6,4 a $25^\circ\text{C}$ , pH 7,4 a $15^\circ\text{C}$ , pH 7,4 a $25^\circ\text{C}$ e pH 7,4 a $35^\circ\text{C}$ . Comprimento de onda excitação de 440 nm com largura de fenda de 5 nm e a emissão monitorada em 530 nm com largura de fenda de 5 nm. ....	47
<b>Figura 19</b> - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da FMN singleto excitada em tampão fosfato pH 6,4 e força iônica = 0,16 M pelo PLP. ....	50
<b>Figura 20</b> - Espectro eletrônico da absorção (a) e de sua derivada (b) da FMN $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa tampão fosfato pH 6,4 na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato com pH 6,4 e força iônica 0,16 M, respectivamente. ....	51
<b>Figura 21</b> - Decaimento de fluorescência da FMN $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de PLP em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M) ....	52



<b>Figura 22</b> - Curvas de decaimento do sinal de $^1\text{O}_2^*$ em 1270nm na ausência e na presença do supressor PLP $1,26 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol.....	54
<b>Figura 23</b> - Voltamogramas cíclicos do PLP $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M) utilizando os seguintes eletrodos: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). As velocidades de varredura utilizadas foram: 20, 50, 100, 200 e 500 $\text{mV s}^{-1}$ .....	55
<b>Figura 24</b> - Corrente de pico anódica <i>versus</i> raiz quadrada da velocidade de varredura da solução de PLP $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M)......	56
<b>Figura 25</b> - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de PLP e FMN operando nos modos de detecção <b>A</b> ) positivo <b>B</b> ) negativo.....	59
<b>Figura 26</b> - <b>Pico 1</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). <b>Pico 2</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). <b>Pico 3</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). <b>Pico 4</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). <b>Pico 5</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). <b>Pico 6</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A)......	60
<b>Figura 27</b> - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de ácido fólico complexado com $\beta$ -LG e FMN operando no modo de detecção positivo. ....	65
<b>Figura 28</b> - <b>Pico 1</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 2</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 3</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 4</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 5</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 6</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 7</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 7 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 8</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 8 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 9</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 9 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 10</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 10 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. <b>Pico 11</b> - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 11 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Gradiente de eluição utilizado na quantificação das vitaminas fotodegradadas .....	36
<b>Tabela 2</b> - Gradiente de eluição utilizado na separação analítica dos fotoprodutos de degradação em uma coluna Agilent C-18. A detecção foi realizada por ESI-MS.....	37
<b>Tabela 3</b> - Valores das constantes de velocidade bimoleculares de desativação ( $^1k_q$ ) do estado singleto excitado da FMN pelo PLP em diferentes condições de pH e temperatura.....	50
<b>Tabela 4</b> - Tempo de vida da FMN $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M) .....	53
<b>Tabela 5</b> - Rendimento quântico obtido pela fotólise da solução de PLP e FMN .....	58
<b>Tabela 6</b> - Rendimento quântico de fotodegradação do ácido fólico e do ácido fólico complexado com $\beta$ -LG sensibilizado por flavinas. ....	64

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** - Esquema ilustrativo para a proposta de degradação do piridoxal-5'-fosfato em matrizes alimentos e em meio de baixa  $P_{O_2}$  induzida por luz e sensibilizado por flavinas. .... 63
- Esquema 2** - Proposta para aumento da fotoestabilidade do ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG sensibilizado pela  $^3\text{FMN}^*$  ..... 70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta$ -LG	beta-lactoglobulina
BDE	bond dissociation energy
<sup>1</sup> FMN*	riboflavina-5'-fosfato singleto excitada
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> *	oxigênio singleto excitado
<sup>3</sup> FMN*	FMN tripleto excitada
<sup>3</sup> Rib*	riboflavina-5'-fosfato tripleto excitada
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
DFT	density functional theory
DNA	deoxyribonucleic acid
ESI	electrospray ionization
ET	electron transfer
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	riboflavina-5'-fosfato
HAT	hydrogen atom transfer
HOO <sup>•</sup>	radical hidroperoxila
HPLC	high performance liquid chromatography
ISC	intersystem crossing
LC	liquid chromatography
m/z	razão massa/carga
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NHE	normal hydrogen electrode
Nd-YAG	neodymium-doped yttrium aluminum garnet
PCET	step-wise proton-coupled electron transfer
PLP	piridoxal-5'-fosfato
Rib <sup>•</sup>	radical ânion semiquinona da riboflavina
RibH <sup>•</sup>	radical semiquinona da riboflavina
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ribonucleic acid
ROO <sup>•</sup>	radical peroxila

SCE	saturated calomel electrode
SPE	solid phase extraction
Sub	substrato
TIC	total ion chromatogram
$t_r$	tempo de retenção
UV	ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. FLAVINAS – VITAMINA B2 .....	16
1.2. FOLATOS – VITAMINA B9 .....	18
1.3. PIRIDOXAL – VITAMINA B6 .....	20
1.4. BIOTINA – VITAMINA B7 .....	22
1.5. NIACINA – VITAMINA B3 .....	23
1.6. BETA-LACTOGLOBULINA (B-LG) .....	25
1.7. FOTOPROPRIEDADES DAS FLAVINAS .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1. REAGENTES .....	32
3.2. PREPARAÇÃO DO SAL DE PARKER.....	32
3.3. CÁLCULO DE INTENSIDADE DA LÂMPADA DA BANCADA FOTOQUÍMICA .....	33
3.4. FOTÓLISE EM BANCADA FOTOQUÍMICA.....	34
3.5. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO QUÂNTICO DE FOTODEGRADAÇÃO DE VITAMINAS .....	35
3.6. DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS FOTOPRODUTOS .....	36
3.7. DESATIVAÇÃO DO ESTADO SINGLETO EXCITADO DA RIBOFLAVINA PELAS VITAMINAS DO COMPLEXO B .....	37
3.8. DESATIVAÇÃO DO ESTADO TRIPLETO EXCITADO DA RIBOFLAVINA PELAS VITAMINAS DO COMPLEXO B .....	38
3.9. DESATIVAÇÃO DE $^1O_2^*$ PELA VITAMINA B6 .....	38
3.10. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B .....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1. ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DO PIRIDOXAL-5'-FOSFATO, BIOTINA E NIACINA SENSIBILIZADOS POR FLAVINAS .....	40
4.2. ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DE FOLATOS SENSIBILIZADOS POR FLAVINAS NA PRESENÇA DE BETA-LACTOGLOBULINA .....	64
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Vitaminas são grupos de compostos orgânicos, que em baixas concentrações, essenciais ao funcionamento normal do corpo humano (ABRANCHES *et al.*, 2008 e YOUNG & NEWBERNE, 1981). As vitaminas *in vivo* apresentam uma ampla gama de funções biológicas, dentre elas pode-se citar: a) atuação como coenzimas ou seus precursores; b) sistema de defesa antioxidante; c) regulação gênica; d) sinalização celular; e) funções específicas tais como visão (vitamina A) e envolvimento em reações de carboxilação (vitamina K) (YOUNG & NEWBERNE, 1981).

No atual cenário do mercado consumidor há uma grande demanda por alimentos de alta qualidade e ricos nutricionalmente, por exemplo, alimentos fortificados e/ou enriquecidos<sup>1</sup>. A indústria de alimentos tem visto a prática de enriquecimento de alimentos como uma eficiente “estratégia de marketing”. Neste contexto, as vitaminas pertencentes ao complexo B dentre elas a riboflavina, a biotina, a niacina, e o ácido fólico têm despertado um grande interesse da indústria para a produção de alimentos enriquecidos e fortificados (ABRANCHES *et al.*, 2008, YOUNG & NEWBERNE, 1981 e LIMA *et al.*, 2004).

Uma grande variedade de produtos alimentícios como leite e derivados, farinhas, cereais, e biscoitos são aqueles tradicionalmente utilizados para o enriquecimento e fortificação com micronutrientes (ABRANCHES *et al.*, 2008 e CATHARINO *et al.*, 2003)

Apesar de nossa extensa compreensão das necessidades nutricionais humanas para a manutenção da saúde, a desnutrição por baixa ingestão calórica continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. Estudos indicam que fatores da dieta influenciam tanto na causa quanto na prevenção de uma grande variedade de doenças como câncer, inflamações, catarata, coceira e depressão (SHILS *et al.*, 1999). No entanto, em populações com ingestão calórica suficiente ou superior a necessidade diária

---

<sup>1</sup> A fortificação é a prática deliberada aumentar o conteúdo de um micronutriente essencial (vitaminas e minerais) em um alimento, de modo a melhorar a qualidade nutricional destes e fornecer benefícios à saúde pública. O enriquecimento é sinônimo de fortificação e refere-se à adição de micronutrientes a um alimento, independentemente dos nutrientes estarem presentes nos alimentos antes de serem processados ou não (ALLEN *et al.*, 2006).

recomendada é comum que indivíduos apresentem alguma deficiência nutricional. A relação entre alta ingestão calórica e deficiência nutricional está em parte relacionada ao aumento do consumo de alimentos processados, industrializados e *fast food* na sociedade moderna em especial em países em desenvolvimento e desenvolvidos (EBBELING *et al.*, 2002).

Alimentos processados e industrializados em geral apresentam a necessidade de enriquecimento ou fortificação com micronutrientes, vitaminas, em função do impacto negativo de alterações físico-químicas e químicas na estabilidade das vitaminas durante as etapas de processamento, transporte, armazenamento e preparo do alimento.

Dentre os diversos fatores responsáveis pela instabilidade química das vitaminas nos alimentos, a exposição à radiação luminosa é determinante principalmente em alimentos ricos ou enriquecidos com vitamina B2 (HUVAERE *et al.*, 2010 e CARDOSO *et al.*, 2012). Um fator que deve ser levado em consideração para estes alimentos é a utilização de embalagens transparentes, pois estas facilitam a oxidação do produto induzida pela luz em uma grande variedade de gêneros alimentícios como o leite e os seus derivados, cerveja e vinhos que são em geral sensíveis à radiação luminosa e essas reações foto-iniciadas afetam não somente a qualidade sensorial, mas também levam a formação de substâncias potencialmente tóxicas e carcinogênicas e a degradação de importantes nutrientes (CARDOSO *et al.*, 2012). Entretanto, pouco é conhecido sobre os processos redox envolvendo vitaminas do complexo B e fotossensibilizados pela riboflavina, bem como a interação destes micronutrientes com constituintes majoritários dos alimentos como, por exemplo, a beta-lactoglobulina no leite e derivados lácteos.

### **1.1. Flavinas – Vitamina B2**

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitol)-isoaloxazina, vitamina B2, é uma substância hidrossolúvel de cor amarela pertencente ao complexo B. Há uma série de variações na estrutura das flavinas que ocorrem naturalmente (ZEMPLINI, 2007). A riboflavina é necessária na síntese das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (riboflavina-5'-fosfato) (FMN) (**Figura 1**), dois cofatores enzimáticos essenciais no funcionamento de enzimas

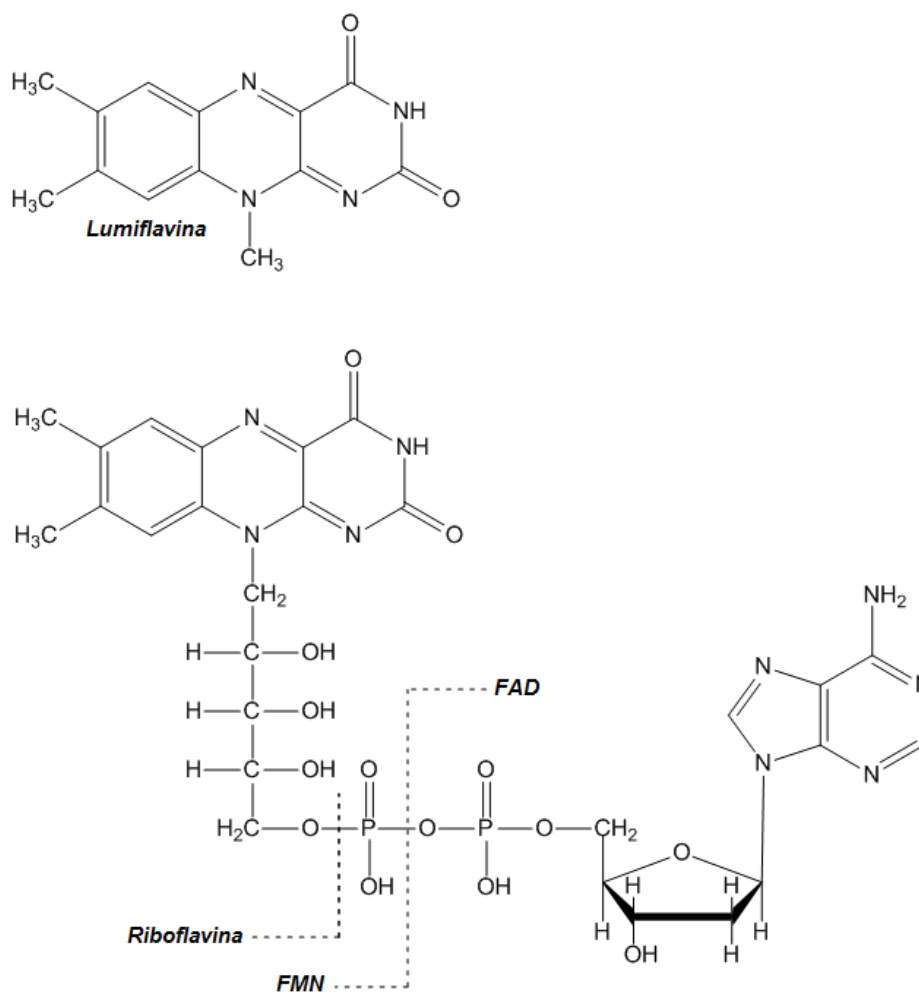


oxirredutases importantes em diversas vias metabólicas. A riboflavina, a FMN e a FAD estão envolvidas em reações redox em função de sua habilidade de aceitar ou doar átomo de hidrogênio ou hidreto (FOX & MCSWEENEY, 1998). A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma de FAD e FMN, ligadas a proteínas. No entanto, quando o bolo alimentar chega ao estômago, o meio ácido propicia a liberação das coenzimas. As coenzimas livres sofrem a ação das pirofosfatases e fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina (de SOUZA *et al.*, 2005). A FMN atua como coenzima de enzimas em uma grande variedade de reações no metabolismo intermediário (MCCORMICK, 1994).

A deficiência de vitamina B2 pode causar uma série de problemas para a saúde humana como rachaduras nos cantos da boca e nariz, estomatite, coceira e ardor nos olhos, inflamações das gengivas com sangramento, língua arroxeadada, pele seca, depressão, catarata, letargia e histeria (de SOUZA *et al.*, 2005, MOREIRA, 1999 e HUANG, 2006).

A riboflavina está presente em alimentos como carne, ovos, leveduras, produtos lácteos e cerveja. A presença desta vitamina, principalmente em produtos lácteos e cerveja, é responsável pela instabilidade fotoquímica destes produtos e determinante no prazo de prateleira e na seleção adequada de embalagens e recipientes não transparentes a radiação luminosa na UVA e UVB.

**Figura 1** - Estrutura química da riboflavina, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e lumiflavina.



**Fonte:** CARDOSO, D. R.; LIBARDI, S. H.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, p. 487-502, 2012.

## 1.2. Folatos – Vitamina B9

O ácido fólico, ácido N-(4-(((2-amino-1,4-dihidro-4-oxo-6-pteridínil)metil)amino)benzoil)-L-glutâmico), folacina ou ácido pteroil-L-glutâmico, também conhecido como vitamina B9 (**Figura 2**), é uma vitamina hidrossolúvel, fotossensível, pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B (SANTOS & PEREIRA, 2007, NASSER *et al.*, 2005, LUCOCK, 2000, BALUZ *et al.*, 2000, MARTIN *et al.*, 2009). Folato é o termo genérico para uma grande classe de compostos que apresentam atividade biológica similar ao ácido pteroilglutâmico. O termo ácido fólico é usado para a forma sintética do folato, encontrada em

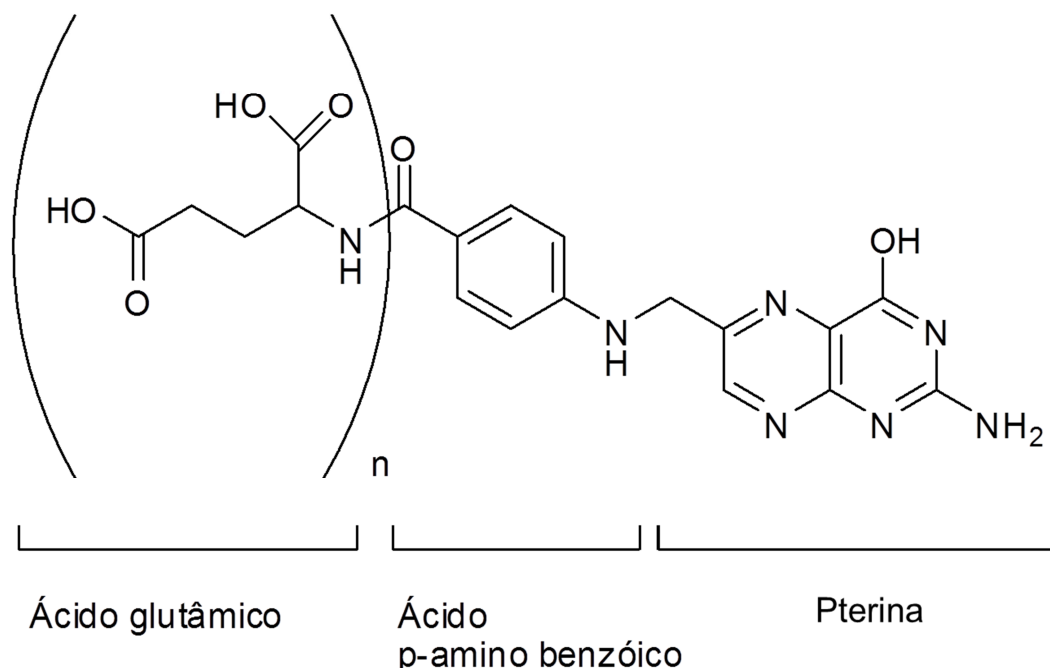
suplementos vitamínicos e alimentos fortificados (ABRANCHES *et al.*, 2008, CATHARINO *et al.*, 2003 e LIMA *et al.*, 2004). O ácido fólico é um composto bioconjugado formado por três sistemas: anel de pterina, uma molécula de ácido *p*-aminobenzóico e uma ou várias unidades de ácido glutâmico (OFF *et al.*, 2005). O organismo humano não é capaz de sintetizar os folatos tendo que obter esta vitamina de fontes exógenas e via absorção intestinal (CHANDLER *et al.*, 2005).

Normalmente os folatos encontram-se na forma de poliglutamatos em alimentos. Após ingestão, no organismo a enzima do pâncreas, folil conjugase, e a conjugase da mucosa da parede intestinal o hidrolisam a monoglutamato antes de sua absorção e transporte do sistema gastrointestinal para a corrente sanguínea. Apenas folatos na forma de monoglutamatos são absorvidos no intestino delgado. O folato é preferencialmente estocado no fígado e secretado na bile, onde a circulação entero-hepática reabsorverá e reutilizará esses folatos, diminuindo as perdas orgânicas (BENDER, 2002, MCNULTY & PENTIEVA, 2004 e BAILEY & GREGORY, 1999).

O ácido fólico atua como coenzima em várias reações celulares fundamentais e é necessário na divisão celular devido ao seu papel na biossíntese de bases purinas e pirimidinas, na síntese do ácido nucléico DNA e RNA, além de atuar no metabolismo do aminoácido glicina. Conseqüentemente, sua deficiência pode ocasionar alterações cromossômicas e na síntese de DNA (SANTOS & PEREIRA, 2007, NASSER *et al.*, 2005, LUCOCK, 2000 E BALUZ *et al.*, 2002). Dificilmente os valores diários recomendados para a ingestão de folatos são alcançados com uma dieta normal e equilibrada tornando necessária a ingestão de alimentos fortificados e/ou enriquecidos (BALUZ *et al.*, 2002).

Folatos que ocorrem naturalmente na dieta, são encontrados em alimentos como morango, vegetais folhosos verde escuros, laranja, amendoim e feijão, como feijão preto e feijão vermelho (SUITOR & BAILEY, 2000), entretanto, a concentração de folatos nestes alimentos é baixa em relação à necessidade de ingestão diária (SCURACHIO *et al.*, 2011).

**Figura 2** - Estrutura química dos poliglutamatos de folato.



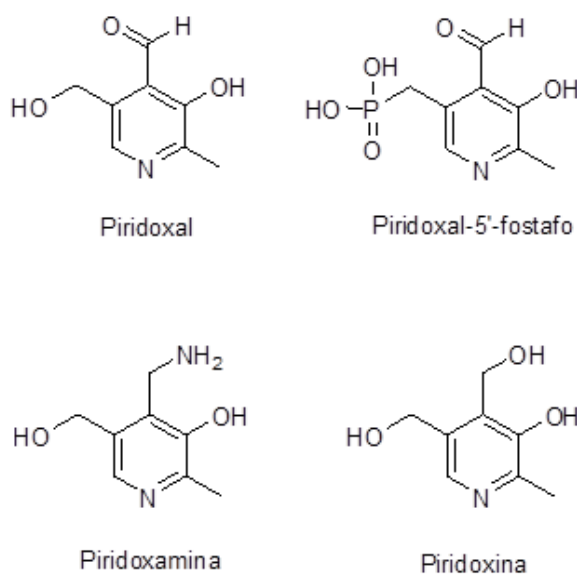
### 1.3. Piridoxal – Vitamina B6

A Vitamina B6 é o termo genérico para os derivados da 3-hidroxi-5-hidroximetil-2-metilpiridina. As três formas de ocorrência natural da vitamina B6 são a piridoxina (álcool), o piridoxal (aldeído) e a piridoxamina (amina); estas formas são metabolizadas à piridoxal-5'-fosfato (PLP) (**Figura 3**) no organismo (BILSKI *et al.*, 2000). Em solução aquosa, suas formas são sensíveis à luz e dependente do pH. O cloridrato de piridoxina é a forma de vitamina B6 mais comumente encontrada em pílulas de vitaminas e utilizada na fortificação de alimentos (SHILS *et al.*, 1999). O PLP é a forma metabolicamente ativa da vitamina e participa como coenzima, principalmente no metabolismo de proteínas. As vitaminas do complexo B fornecem cofatores ou grupos prostéticos de várias reações enzimáticas, porém a vitamina B6 é a única que está envolvida no metabolismo de todos os três macronutrientes: proteínas, lipídios e carboidratos. As enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos utilizam o PLP como cofator, logo a exigência dessa vitamina está relacionada com o teor de proteínas da dieta. Através de reações envolvendo a aminoácido descarboxilase na produção de neurotransmissores, monoamina, a vitamina B6 está intimamente associada com a função do sistema nervoso

(ZEMPLINI, 2007). A forma PLP é encontrada ligada covalentemente ao sítio ativo das enzimas,  $\epsilon$ -amino da lisina, via base de Schiff. Na formação da base de Schiff, o forte caráter atrator de elétrons do anel de piridínico e à retirada subsequente de elétrons a partir de um dos três substituintes (Grupo R, o hidrogênio, ou grupo carboxilo) anexado ao carbono  $\alpha$  do aminoácido são características chave na maioria de reações enzimáticas (LEUSSING, 1986). Cerca de 100 reações enzimáticas têm sido relatadas onde o PLP desempenha um papel de coenzima (SAUBERLICH, 1985 e COBURN, 1994). Reações de transaminação representam 40% das reações PLP-catalisadas.

A vitamina B6 está presente em uma grande variedade de alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal, nos quais ocorre em altas concentrações. A vitamina também é encontrada complexada com íons metálicos em pequenas quantidades nos alimentos, principalmente nos de origem animal. Em grãos de cereais, a vitamina B6 está presente principalmente no gérmen e na camada de aleurona. Porém, em consequência do refino dos grãos para a produção de farinha, muitas dessas frações são removidas, diminuindo substancialmente as concentrações da vitamina nestes alimentos (COMBS, 1998).

**Figura 3** - Estrutura química do piridoxal, piridoxal-5'-fosfato, piridoxamina e da piridoxina.



#### **1.4. Biotina – Vitamina B7**

A D-(+)-biotina, ácido hexa-hidro-2-oxo-1H-tieno(3,4-*d*)imidazol-4-pentanóico, (**Figura 4**) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B. A biotina atua como coenzima em reações de carboxilação em importantes processos biológicos (PENTEADO, 2003).

A biotina possui três carbonos assimétricos em sua estrutura, oito estereoisômeros, porém apenas um designado como D-(+)-biotina, é encontrado na natureza e enzimaticamente ativo. A biotina é um composto bicíclico, um dos anéis contém um grupo ureído (-N-CO-N-) e o outro é um anel tetrahidrotiofeno covalentemente ligado a uma cadeia lateral correspondente ao ácido valérico (ZEMPLINI, 2007).

Em contraste com a reputação da labilidade das vitaminas, a biotina é uma vitamina muito estável termicamente e pode ser autoclavada sem ser afetada, podendo ser extraída totalmente de amostras biológicas. Entretanto, pode ser facilmente oxidada à sulfóxidos e sulfonas derivadas de biotina (DE LEENHEER *et al.*, 2000).

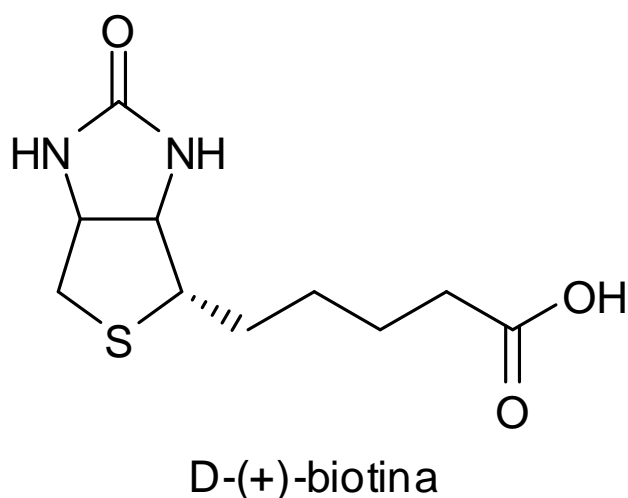
Nos mamíferos, a biotina é um cofator essencial para quatro carboxilases, cada uma delas catalisa uma etapa crítica no metabolismo intermediário na incorporação de bicarbonato de um grupo carboxilo em um substrato. Todas as quatro carboxilases usam um mecanismo catalítico semelhante. A ligação da biotina à carboxilase é uma reação de condensação catalisada pela sintetase holocarboxilase. Uma ligação amida é formada entre o grupo carboxilo da cadeia lateral de ácido valérico da biotina e do grupo de  $\epsilon$ -amino de um resíduo específico lisina na carboxilase (SHILS *et al.*, 1999).

Além de exercer função de coenzima, a biotina também pode atuar na regulação da expressão gênica (DAKSHINAMURTI, 2005). A carência desta vitamina no organismo humano é considerada rara, mas pode ser observada em casos de má nutrição, deficiência da biotinidase e das carboxilases (PENTEADO, 2003 e WISNITZER & BANGERT, 2003). A biotinidase é uma enzima responsável pela quebra da ligação do complexo biotina-proteína proveniente da dieta ou de peptídeos fornecendo biotina livre no organismo. Esta deficiência pode ser parcial ou total (SEYMONS *et al.*, 2004). Os sintomas são crises convulsivas, retardamento

mental, atraso no desenvolvimento psico-motor, dermatites, alopecia, predisposição a infecções, acidemia orgânica e acidose cetolática (WOLF *et al.*, 1983).

Fontes mais ricas de biotina são o fígado bovino, gema de ovo e levedo. Ela é utilizada no tratamento de doenças de pele, preparação de cosméticos e adicionada a ração de animais domésticos para atuar como agente de crescimento (PENTEADO, 2003 e STREIT & ENTCHEVA, 2003).

**Figura 4** - Estrutura química da biotina.



### 1.5. Niacina – Vitamina B3

A niacina é o termo genérico para o ácido nicotínico e a nicotinamida (**Figura 5**). A vitamina B3 é o grupo funcional das coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e seu éster de fosfato (NADP), essencial para processos redox envolvendo carboidratos, lipídeos e proteínas (ALLEN *et al.*, 2006). O ácido nicotínico é um sólido cristalino branco, estável no ar à temperatura ambiente. É moderadamente solúvel em água e álcool, mas insolúvel em éter. Em contraste com o ácido nicotínico, a nicotinamida é altamente solúvel em água e solúvel em éter, características que permitem a separação dos dois vitâmeros (ZEMPLINI, 2007).

As formas biologicamente ativas de compostos de niacina são as coenzimas NAD e NADP. A posição C-4 sobre o anel de piridina da nicotinamida participa em reações de oxidação e redução. Devido à eletronegatividade do grupo amida na posição 1 sobre este anel, os íons hidreto podem prontamente reduzir a posição C-4

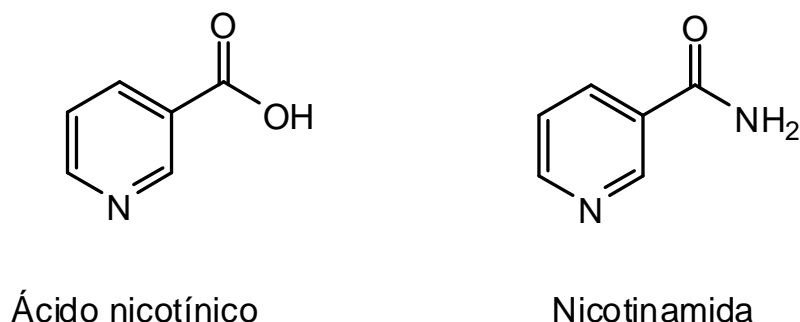
oxidada. Esta é a base para as reações de transferência de elétrons enzimáticas que são presentes entre organismos.

As formas oxidadas e reduzidas das coenzimas são designadas  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NADH}$  ou  $\text{NADPH}$ , respectivamente. As designações  $\text{NAD}$  e  $\text{NADP}$  são usadas para descrever as reservas totais destas coenzimas. Isso é muitas vezes necessário se o método de quantificação não faz distinção entre as formas oxidadas e reduzidas. A quantidade total de todas as quatro formas pode ser referida como  $\text{NAD(P)}$  (ZEMPLINI, 2007).

Quantidades significativas de niacina são encontradas em carnes (carne especialmente vermelha), fígado, leguminosas, leite, ovos, alfafa, grãos de cereais, leveduras, peixes e milho (BUDAVARI, 1996). Embora o leite e ovos contenham pequenas quantidades de niacina pré-formada, o seu teor de triptofano fornece mais do que seus equivalentes suficientes de niacina. A carne vermelha é relatada como sendo uma das melhores fontes de niacina por causa de sua abundância da niacina pré-formada e triptofano. Cerca de 60 g do aminoácido é convertido a 1 g da vitamina. Supondo-se que 1% (m / m) de proteínas é triptofano, 60 g de proteína poderiam fornecer 600 mg de triptofano ou 10 equivalentes de niacina (1 equivalente a niacina é igual a 1 mg de ácido nicotínico ou nicotinamida, que por sua vez corresponde a 8,13 mmol). Quantitativamente, o uso mais importante deste aminoácido é na biossíntese de proteína. Nos seres humanos, a quantidade de triptofano convertido para niacina depende da história nutricional (NAKAGAWA *et al.*, 1973) e fatores hormonais (HORWITT *et al.*, 1981). Se há uma deficiência de triptofano e niacina no corpo, o triptofano é usado primeiramente para manter a síntese de proteínas ao invés de reabastecer as reservas de niacina. Os contraceptivos orais e gravidez podem tanto aumentar a conversão do triptofano em niacina (HORWITT *et al.*, 1981).



**Figura 5** - Estrutura química da niacina: ácido nicotínico e nicotinamida.

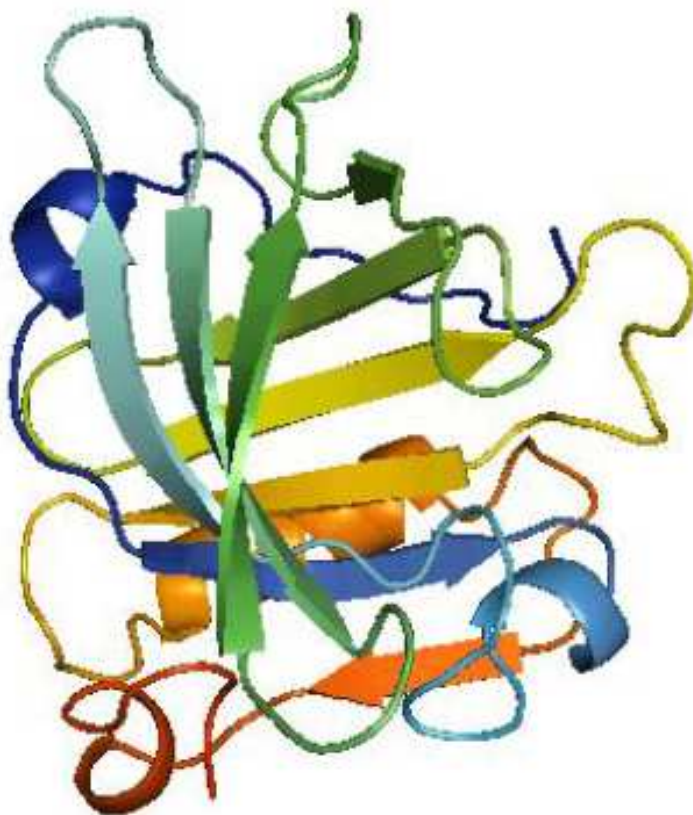


### 1.6. *Beta-lactoglobulina* ( $\beta$ -LG)

A beta-lactoglobulina (**Figura 6**) é o principal constituinte das proteínas do soro do leite correspondendo a 50% delas e 12% do total das proteínas totais do leite bovino (FOX & MCSWEENEY, 1998). Possui 168 aminoácidos, estrutura globular com massa molecular de 18,4 kDa e ponto isoelétrico de 4,8 (HAUG *et al.*, 2009). A estrutura secundária da  $\beta$ -LG é majoritariamente composta de  $\beta$ -folhas (54%) e  $\alpha$ -hélices (17%). Sua estrutura tridimensional apresenta um sítio hidrofóbico em forma de cálice e por este motivo pertencente à família das lipocalinas, proteínas com função de transporte (KONTOPIDIS *et al.*, 2004).

A  $\beta$ -Lg, por exemplo, é capaz de se ligar a moléculas hidrofóbicas e pode funcionar *in vivo* como um mecanismo de transporte de retinol para o intestino delgado. Também se liga aos ácidos graxos e pode estimular a atividade das lípases (WELCH *et al.*, 1997). O ácido fólico liga-se à superfície de  $\beta$ -LG, possivelmente na cavidade entre a  $\alpha$ -hélice e a  $\beta$ -folha. Análises de fluorescência da porção pterina do ácido fólico mostram que a complexação com  $\beta$ -LG melhoram sua fotoestabilidade. Sugere-se que complexos com a  $\beta$ -LG poderiam ser usados como transportadores eficazes de ácido fólico em alimentos funcionais (LIANG & SUBIRADE, 2010).

**Figura 6** - Estrutura cristalográfica da  $\beta$ -LG a pH 7,1.



**Fonte:** LIBARDI, Silvia H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferritmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal.** 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

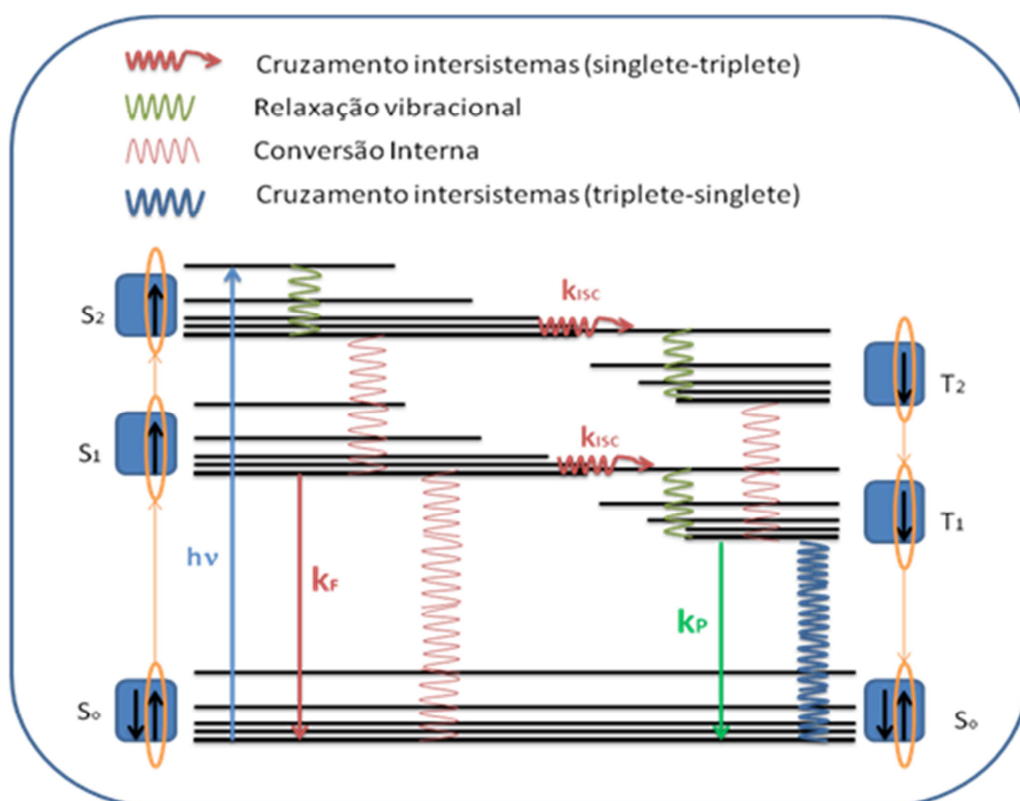
### **1.7. Fotopropriedades das Flavinas**

O grupo cromóforo, anel tricíclico de isoaloxazina, comum a todas as flavinas, possui duas bandas características de absorção na região do visível com máximo de absorção em 375 e 446 nm. Os correspondentes valores de absorvidade molar ( $\epsilon_{375\text{nm}} = 9155 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   $\epsilon_{446\text{nm}} = 10645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (FUH, 2011), consideravelmente altos, são um indicativo de transições  $\pi - \pi^*$  resultando em estado singlete excitado.

A fluorescência do estado transiente (ca. 5 ns) excitado  $S_1$  ( $\lambda = 530\text{nm}$ ) é competitiva com o cruzamento intersistemas (ISC) levando a molécula ao estado metaestável tripleto excitado de menor energia e maior tempo de vida (ca.15  $\mu\text{s}$ )

com alto rendimento quântico  $\Phi = 0,67$  (CARDOSO *et al.*, 2012). O diagrama de Jablonski (**Figura 7**) é uma representação energética das transformações eletrônicas que podem ocorrer em um processo fotoquímico e ilustra o processo de formação do estado tripleto excitado após a inicial absorção da radiação luminosa.

**Figura 7** - Diagrama de Jablonski;  $S_0$ = estado fundamental;  $S_1$ = primeiro estado excitado singleto;  $S_2$ = segundo estado excitado singleto;  $T_2$ = segundo estado excitado tripleto;  $T_1$ = primeiro estado excitado tripleto;  $k_{ISC}$  = constante cruzamento intersistemas =  $2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_f$  = constante de fluorescência =  $5,4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ .

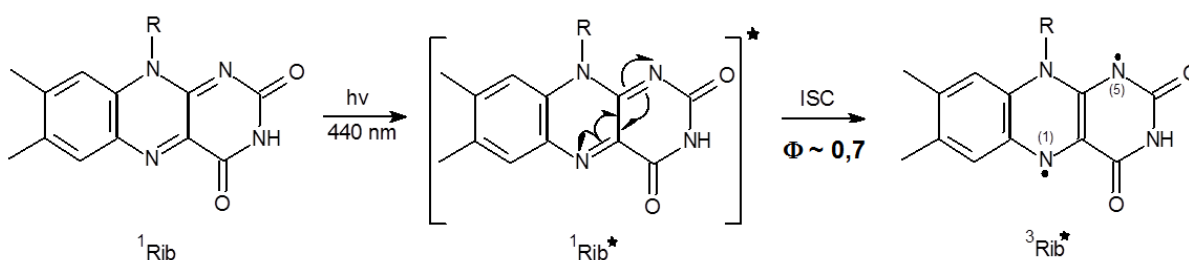


O estado tripleto excitado das flavinas decai através de transições radioativas, (**Figura 7**), exibindo emissão de luz laranja-vermelho ( $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ ), fosforescência, apenas a baixas temperaturas (BOWD *et al.*, 1968). Contrariamente ao baixo valor de rendimento quântico observado para o processo de fosforescência, dados da fotólise por pulso de laser em nanosegundos (espectroscopia de transientes) revelam um eficiente cruzamento intersistemas ( $S_1 \rightarrow T_n \geq 1$ ) com  $\Phi = 0,7$  (BECKER *et al.*, 2005). O decaimento do estado tripleto excitado é evidente, já o processo de fosforescência é observado em uma intensidade muito baixa e apenas quando em baixas temperaturas. Além disto, é reportado que o estado tripleto

excitado sofre reação bimolecular com diversos substratos (BECKER *et al.*, 2005 e CARDOSO *et al.*, 2007).

Cálculos *ab initio* empregando a teoria da densidade funcional (DFT) revelam que N(1) e N(5) possuem a maior porcentagem da densidade de spin total e assim o estado tripleto excitado da riboflavina ( $T_n$ ) pode ser descrito como um birradical (HUVAERE *et al.*, 2010), como ilustrado na **Figura 8**. Estes dados são confirmados pela observação do aumento da distância de ligação N(1)-C(10') e N(5)-C(4') com respeito ao estado fundamental, enquanto que a ligação C(4') e C(10') é encurtada por 0,05Å (LU *et al.*, 2004). Entretanto, estas alterações ocasionam alterações no espectro de absorção do estado tripleto excitado.

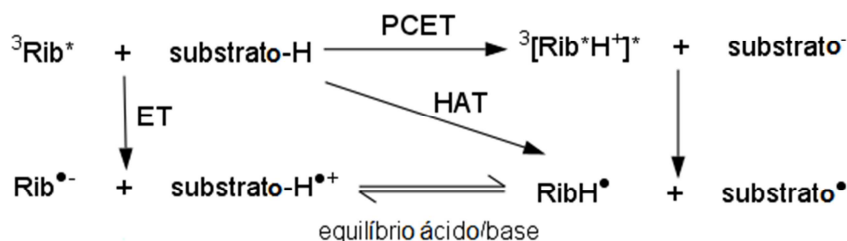
**Figura 8** - Formação do estado tripleto excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa (440 nm).



Assim, como o potencial de redução é deslocado de -0,3 V para a riboflavina no estado fundamental a 1,7 V vs. NHE para seu estado tripleto excitado, pode-se dizer que a riboflavina passa a ser um potente oxidante quando fotoexcitada (CARDOSO *et al.*, 2007). Desta forma, a transferência de elétrons do substrato para o estado tripleto excitado leva a formação do radical ânion semiquinona da riboflavina  $\text{Rib}^{\bullet-}$  ( $\text{pKa} \sim 8$ ) ou, dependendo do pH do meio reacional e mecanismo de reação (transferência de elétron (ET), transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e transferência de elétron acoplada a próton (PCET) (**Figura 9**), forma-se o radical semiquinona da riboflavina  $\text{RibH}^{\bullet}$  ( $E = -0,1\text{V}$ ). O radical semiquinona pode então ser oxidado pelo oxigênio molecular levando a formação do íon superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e posteriormente via reação de dismutação formar o radical hidroperoxila ( $\text{HOO}^{\bullet}$ ;  $\text{pKa} = 4,8$ ) ou peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, como o oxigênio permanece no estado fundamental (birradical), reações de recombinação com radicais fotoinduzidos ocorrem rapidamente formando radicais peroxila reativos ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), os quais podem promover danos em biomoléculas (LU *et al.*, 2004).

Os substratos que formam radicais cátions muito ácidos e exibem alto  $E^\circ$  evitam o substrato- $H^{\bullet+}$  como uma reação intermediária e reagem pelo mecanismo HAT diretamente formando  ${}^2\text{RibH}^\bullet$  e substrato $^\bullet$  como produtos. Os substratos com  $E^\circ$  menores que  $E^\circ$  da  ${}^3\text{Rib}^*$  mas que formam um radical cátion muito ácido evitam o substrato- $H^{\bullet+}$  como uma reação intermediária através de uma transferência de prótons para a  ${}^3\text{Rib}^*$  antes da transferência de elétrons como no mecanismo PCET. Os substratos que desativam o estado tripleto excitado da riboflavina mostram constantes bimoleculares em dois grupos separados variando de  $10^8$  a  $10^9$   $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$  e de  $10^5$  a  $10^7$   $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ . A propriedade termodinâmica limitante para guiar a ET (ou PCET) é o potencial de oxidação de um elétron inferior a 1,8V (vs. NHE) para o substrato redutor, enquanto para o mecanismo HAT o fator termodinâmico limitante é uma energia de dissociação de ligação inferior a 300  $\text{kJ mol}^{-1}$  (CARDOSO *et al.*, 2012).

**Figura 9** - Ciclo termodinâmico de processos de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina com substrato por transferência de elétron (ET), transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e transferência de elétron acoplada a próton (PCET).



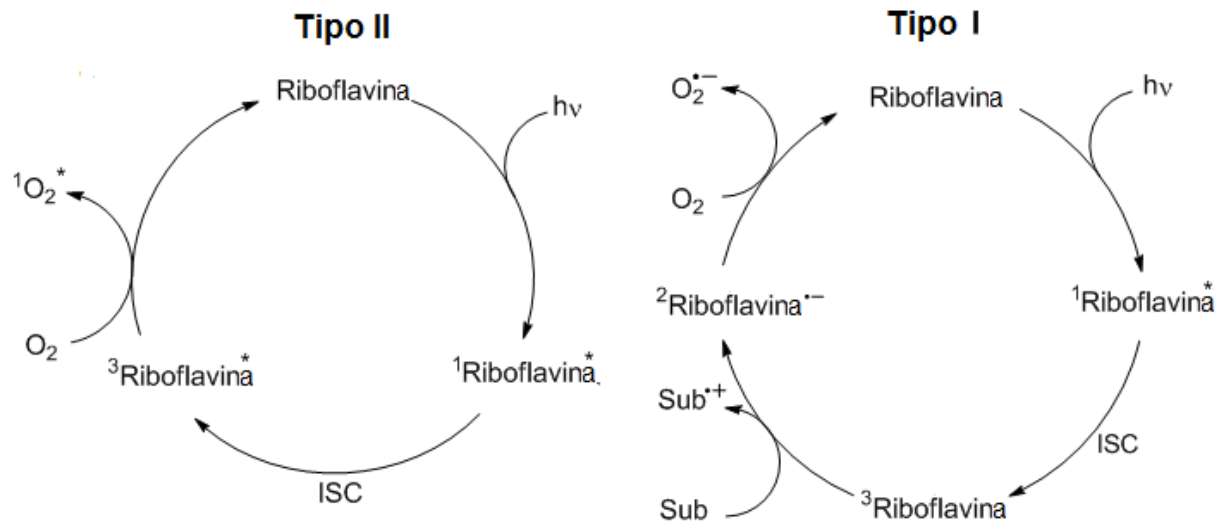
O oxigênio molecular,  ${}^3\text{O}_2$ , também é um conhecido supressor do estado tripleto excitado da riboflavina ( $k= 9,8 \cdot 10^8$   $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) produzindo oxigênio singleto excitado ( ${}^1\text{O}_2^*$ ), o qual está envolvido em vários processos oxidativos através de reações do tipo ene e cicloadição (DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

A riboflavina pode atuar como fotossensibilizador por dois mecanismos (Tipo I e II), e a importância relativa de cada um depende do substrato (SKIBSTED, 2000 e EDWARDS & SILVA, 2001).

As reações envolvendo oxigênio singleto excitado via fotoquímica são geralmente referidas como fotorreação do Tipo II, enquanto que a interação direta do

estado tripleto da riboflavina excitada ( $^3\text{Rib}^*$ ) com o substrato é conhecida como fotorreação do Tipo I. A **Figura 10** ilustra as reações de fotossensibilização (Tipo I e Tipo II) os quais a riboflavina pode estar envolvida em meio biológico (SONG & HWANG, 2007).

**Figura 10** - Esquema do mecanismo de fotooxidação do Tipo I e Tipo II.



**Fonte:** CARDOSO, D. R.; LIBARDI, S. H.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, p. 487-502, 2012.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar a degradação fotossensibilizada das vitaminas do complexo B (ácido fólico, piridoxal, biotina e niacina) por flavinas visando o conhecimento do mecanismo reacional, Tipo I (radicalóide) ou Tipo II ( $^1\text{O}_2^*$ ), em matrizes alimentos contendo estas vitaminas. Para alcançar este objetivo, o trabalho foi dividido em etapas:

Os objetivos específicos deste trabalho estão relacionados abaixo:

- Determinar o rendimento quântico de fotodegradação das vitaminas do complexo B por flavinas na presença e ausência de oxigênio em meio aquoso e de óxido de deutério;
- Identificar a formação de possíveis fotoprodutos;
- Realizar um estudo cinético da desativação dos estados singleto e tripleto excitados das flavinas pelas vitaminas do complexo B;
- Investigar a desativação  $^1\text{O}_2^*$  pela vitamina B6;
- Determinar o potencial de oxidação das vitaminas do complexo B.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Reagentes**

Os padrões de grau analítico das vitaminas biotina, nicotinamida, ácido nicotínico, piridoxal-5'-fosfato, ácido fólico e riboflavina-5'-fosfato foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem prévio tratamento. A proteína beta-lactoglobulina obtida da Sigma-Aldrich grau de pureza >90 % (SDS-PAGE) foi purificada via cromatográfica. Os sais utilizados  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , NaCl e KOH foram todos de grau analítico e fornecidos pela J. T. Baker. O sal de oxalato de potássio foi fornecido pela Reagen (Quimibras) e o sal de cloreto de ferro III hexahidratado fornecido pela Merck, ambos de grau analítico ACS. O ácido acético de grau HPLC foi obtido da Tedia. O ácido clorídrico 36-38% e o ácido sulfúrico, ambos de grau analítico, foram obtidos da J. T. Baker. O ácido fórmico 98-100% grau espectrométrico fornecido pela Merck. Os solventes de grau HPLC acetonitrila, metanol e etanol foram fornecidos pela J. T. Baker ou Tedia. A água deuterada foi fornecida pela Sigma-Aldrich. A 1,10-fenantrolina grau analítico foi fornecida pela QHEMIS e previamente recristalizada. O argônio utilizado de alto grau de pureza (99.999 %) foi fornecido pela White Martins. A água utilizada foi previamente destilada e posteriormente deionizada em um sistema Milli-Q Millipore Co. (18,2 MΩ cm a 25 °C).

### **3.2. Preparação do Sal de Parker**

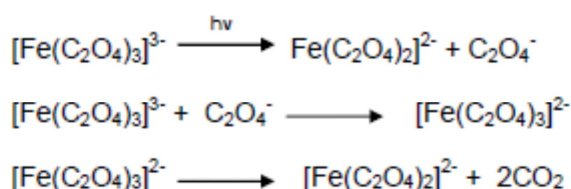
Para o preparo do sal de Parker foram dissolvidos 120g de oxalato de potássio em 200 mL de água deionizada. Separadamente, também foram dissolvidos 82g de cloreto de ferro(III) hexahidratado em 800 mL de água deionizada. Ambas as soluções foram aquecidas a 60°C e em seguida misturadas e resfriadas a 0°C em banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com metanol gelado. Em seguida, o produto foi dissolvido em 200 mL de água deionizada e aquecido a 60°C onde foi novamente resfriado a 0°C. O procedimento de filtração a vácuo e a lavagem com metanol gelado foi novamente



realizado para que houvesse a recristalização do produto. O sólido foi transferido para um béquer para posterior determinação da quantidade de água de cristalização do Sal de Parker por gravimetria. Após este procedimento, preparou-se uma solução 0,15 mol L<sup>-1</sup> do sal obtido utilizando como solvente uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico.

### 3.3. Cálculo de Intensidade da lâmpada da bancada fotoquímica

O actinômetro químico ferrioxalato de potássio K<sub>3</sub>[Fe(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>] é um actinômetro adequado e exato na faixa de 253-577 nm. O íon complexo [Fe(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup> ao ser irradiado sofre as seguintes reações químicas:



Assim, a quantidade de íons de Fe(II) foto-gerada pode ser determinada espectrofotometricamente a 510 nm através da complexação do íon Fe(II) com 1,10-fenantrolina. A concentração de íons Fe(II) fotogerados é proporcional ao número de fótons absorvidos pelo actinômetro no comprimento de onda de irradiação. A intensidade da radiação luminosa é então dada pela expressão:

$$\frac{\Delta A \times V_1 \times V_3}{\epsilon_{\text{Fe}} \times t \times V_2 \times f \times \phi_{\text{Fe}}}$$

onde:

$\Delta A$ = diferença da absorbância a 510 nm da solução actinométrica irradiada e da absorbância a 510 nm do branco;

$\epsilon_{\text{Fe}}$ = coeficiente de extinção do complexo ferro 1,10-fenantrolina em 510 nm (1,11 10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (ALWERT, 1967);

$V_1$ = volume da solução de actinômetro irradiada (mL);

$V_2$ = volume da alíquota de solução irradiada para análise (mL);

$V_3$ = volume final, ou seja, volume do balão volumétrico no qual  $V_2$  foi diluído;

t= tempo de irradiação em minutos;

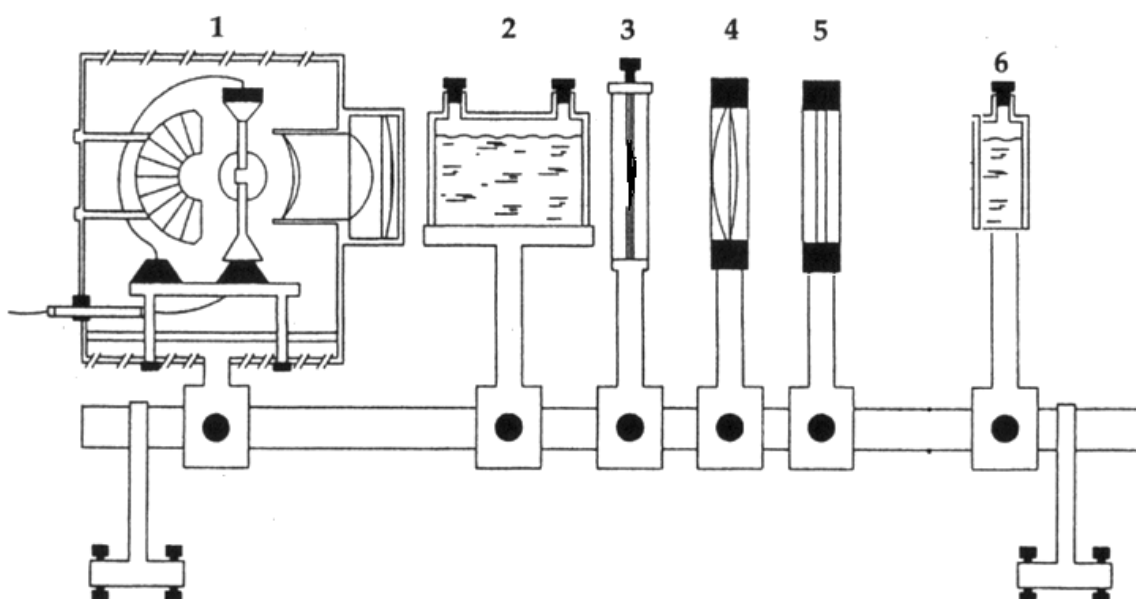
f= fração da luz absorvida pela solução irradiada no comprimento de onda de irradiação (para 440 nm o valor de f= 0,997) (ALWERT, 1967);

$\Phi_{Fe}$ = rendimento quântico de formação do íon Fe(II) no comprimento da luz irradiada (para o comprimento de onda utilizado  $\lambda= 440\text{nm}$ , o valor de  $\Phi_{Fe}= 1,01 \text{ mol Einstein}^{-1}$ ) (ALWERT, 1967).

### **3.4. Fotólise em Bancada Fotoquímica**

Os experimentos de fotólise contínua foram realizados em uma bancada fotoquímica fabricada pela Oriel (**Figura 11**) empregando-se radiação luminosa contínua, lâmpada de Hg de alta pressão, com comprimento de onda apropriado selecionado por filtros de interferência (440 nm). As amostras de biotina, nicotinamida, ácido nicotínico  $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , piridoxal-5'-fosfato  $5.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , ácido fólico  $5.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  complexado com a proteína beta-lactoglobulina  $5.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foram irradiadas separadamente na presença e ausência de oxigênio e com a riboflavina  $1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 6,4 ou em meio de óxido de deutério pD 6,4. O cálculo da intensidade de radiação incidente pelo uso do actinômetro químico ( $K_3[Fe(C_2O_4)_3]$ , tris(oxalato)ferrato(III) de potássio,  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ) seguiu o procedimento descrito na literatura por Simone *et al.*, 2002.

**Figura 11** - Bancada fotoquímica Oriol. (1) Lâmpada de Hg, (2) Filtro de calor, (3) Janela, (4) Lente de foco, (5) Filtro de Interferência (440 nm), (6) Porta amostra.



### **3.5. Determinação do Rendimento Quântico de Fotodegradação de Vitaminas**

Para o cálculo do rendimento quântico de fotodegradação das vitaminas foram preparadas soluções de biotina, nicotinamida, ácido nicotínico  $1.10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, piridoxal-5'-fosfato  $5.10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, e do ácido fólico  $5.10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> complexado com a proteína beta-lactoglobulina ( $5.10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) cada uma delas com riboflavina  $1.10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato com pH 6,4 e força iônica de 0,16 M, tanto em água deionizada quanto em óxido de deutério. Estas soluções foram irradiadas cada uma com o melhor tempo definido por prévia fotólise utilizando-se a mesma bancada fotoquímica já citada. Este procedimento foi realizado novamente para as mesmas soluções saturadas com argônio (5.0) por 60 minutos. A quantificação analítica da biotina, nicotinamida, ácido nicotínico e do piridoxal-5'-fosfato foi realizada através do uso da cromatografia em fase líquida utilizando-se um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC20AD Prominence acoplado a espectrômetro de massas de múltiplo estágio com analisador de massas do tipo "ion-trap" e interface de ionização por electrospray (ESI) Bruker modelo Esquire 4000. A coluna cromatográfica de fase reversa utilizada foi uma Agilent Extend C-18 (5 µm; 2,1x150 mm). A fase móvel

utilizada no gradiente de eluição foi: fase A – Água/Ácido Fórmico (0,1% v/v); fase B – Acetonitrila/Ácido Fórmico (0,1% v/v) com fluxo utilizado de 0,350 mL min<sup>-1</sup>. Utilizou-se um divisor de fluxo na interface HPLC/MS, cujo fluxo que chegou até o espectrômetro de massas foi de 175 µL min<sup>-1</sup>. Foram construídas curvas de calibração externa para cada uma das vitaminas investigadas obtendo-se coeficiente de correlação para o gráfico de Área do pico cromatográfico *versus* concentração analítica da vitamina igual ou superior a 0,95.

A quantificação analítica do ácido fólico complexado com a proteína beta-lactoglobulina foi realizada através de uma curva de calibração externa utilizando-se um cromatógrafo líquido constituído por duas bombas Shimadzu modelo LC10AD, injetor Rheodyne modelo 8125 com loop de 50 µL acoplado a um detector UV-visível de arranjo de diodos Shimadzu modelo SPD-6AV. A fase móvel utilizada foi: fase A - água/ácido acético 2% (v/v) com pH ajustado a 2,8 com solução de hidróxido de potássio (1 mol L<sup>-1</sup>) e a fase B - acetonitrila. A coluna utilizada foi Waters Spherisorb C-18 com dimensões 4,6 x 250 mm acoplada a uma pré-coluna. O gradiente de eluição utilizado está na **Tabela 1**. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 25 µL. Com os valores de intensidade da luz e o número de mols do ácido fólico determinou-se o valor do rendimento quântico.

**Tabela 1** - Gradiente de eluição utilizado na quantificação das vitaminas fotodegradadas

Tempo (minutos)	% da fase B
0-5	0
5-20	15
20-30	90
30-35	0

### **3.6. Determinação dos Principais Fotoprodutos**

A identificação dos fotoprodutos majoritários formados nas apropriadas fotólises foi investigada em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu modelo LC20AD Prominence acoplado a espectrômetro de massas de múltiplo estágio com analisador de massas do tipo “ion-trap” e interface de ionização por electrospray (ESI) Bruker modelo Esquire 4000. Condições de nebulização: pressão 50 psi; fluxo

do gás (N<sub>2</sub>) 9 L min<sup>-1</sup>; temperatura 365°C. Voltagem do capilar: 3500 V. Para detecção utilizam-se os modos positivo e negativo. A fase móvel utilizada no gradiente de eluição foi: fase A – Água/Ácido Fórmico (0,1% v/v); fase B – Acetonitrila/Ácido Fórmico (0,1% v/v). O fluxo utilizado foi de 0,350 mL min<sup>-1</sup> e a coluna para separação Agilent Extend C-18 (5µm; 2,1x150 mm).O gradiente de eluição utilizado é descrito na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Gradiente de eluição utilizado na separação analítica dos fotoprodutos de degradação em uma coluna Agilent C-18. A detecção foi realizada por ESI-MS

Tempo (minutos)	% da fase B
0-5	0
5-20	15
20-30	90
30-35	0

### **3.7. Desativação do estado singleto excitado da riboflavina pelas vitaminas do complexo B**

Os experimentos foram realizados em espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500, utilizando-se as soluções de FMN 1 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e de cada uma das vitaminas do complexo B variando-se as concentrações analíticas das vitaminas em questão. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico e quatro faces polidas. A velocidade de escaneamento foi de 1200 nm min<sup>-1</sup> e abertura da fenda de excitação de 5 nm e da fenda de emissão de 5 nm. Observou-se a partir dos espectros se havia um decréscimo na intensidade de emissão monitorada em 530nm (excitação em 440 nm) com o aumento da concentração do supressor.

O experimento de fluorescência resolvida no tempo foi realizado em um fluorímetro desenvolvido pela Optical Building Blocks Corporation com resolução temporal de 100 ps, usando um circuito à base de diodo emissor de luz para a excitação da amostra em 280nm e filtros de corte de emissão em 305 nm. Os resultados obtidos no fluorímetro resolvido no tempo foram utilizados na avaliação do tempo de decaimento de fluorescência da FMN 100 µmol L<sup>-1</sup> na presença e

ausência do supressor piridoxal-5'-fosfato. Também foi realizado um estudo do tipo de supressão (estática ou dinâmica) do sistema químico.

### **3.8. Desativação do estado tripleto excitado da riboflavina pelas vitaminas do complexo B**

Os experimentos de transientes foram realizados com o modelo LFP-112 nanosecond laser flash photolysis da Luzchem. O terceiro harmônico da Brilliant B Nd-YAG, em 355nm, atenuado a 14 mJ, com pulsos de 8 ns, foi utilizado como fonte de excitação da amostra. As análises cinéticas foram realizadas com o software do fabricante.

Um tubo fotomultiplicador foi utilizado para detectar a absorção do transiente (300-800nm). Cada traço cinético representa uma média de 16 varreduras independentes e as constantes de velocidade observadas foram determinadas pelo ajuste não linear da equação  $f(A) = e^{-kt} + C$  aos dados com o auxílio do software Microcal OriginPro 8.0. Os experimentos foram realizados com soluções de riboflavina 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e das vitaminas do complexo B variando-se as concentrações analíticas das vitaminas em questão previamente saturadas com  $\text{N}_2$  (5.0) por 60 minutos antes do experimento.

### **3.9. Desativação de $^1\text{O}_2^*$ pela vitamina B6**

Os experimentos foram realizados para se observar a interação das vitaminas do complexo B diretamente com o oxigênio singleto. O oxigênio singleto foi gerado a partir da irradiação do azul de metileno em  $\lambda = 355 \text{ nm}$  por meio de um sistema composto de um laser Nd-YAG (Continuum surelite III) onde foi monitorada a intensidade de fosforescência do  $^1\text{O}_2^*$  em 1270nm em função do tempo. Os experimentos foram realizados em solução etanólica de PLP  $1,26 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

### **3.10. Determinação do potencial de oxidação das vitaminas do complexo B**

Para a determinação do potencial de oxidação das vitaminas do complexo B foi utilizada a técnica de voltametria cíclica onde as vitaminas estavam em uma concentração de  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato com  $\text{pH} = 6,4$  e força iônica  $I = 0,16 \text{ M}$  (ajustada com NaCl). Os experimentos foram realizados em uma cela eletroquímica com três eletrodos sob atmosfera de argônio. O equipamento utilizado foi um potenciostato EG&G PAR (Princeton Applied Research), modelo 264A. Os eletrodos utilizados foram: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e platina (contra-eletrodo).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

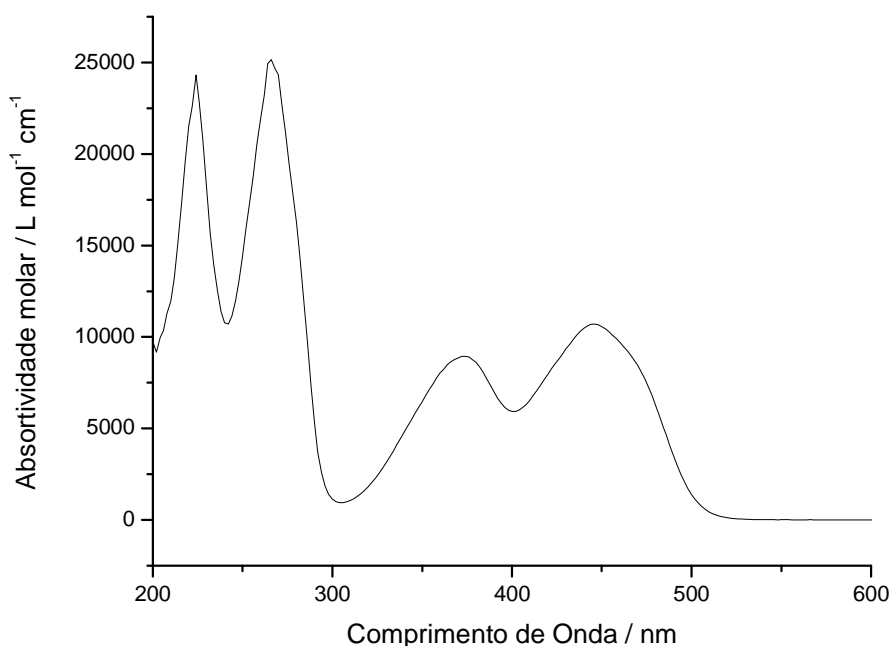
### ***4.1. Estudo da fotodegradação do piridoxal-5'-fosfato, biotina e niacina sensibilizados por flavinas***

Conforme ao reportado na seção fotopropriedades das flavinas, a vitamina B2 apresenta-se como um importante oxidante biológico, ativado com luz, e capaz de oxidar uma ampla gama de biomoléculas. Produtos lácteos estão entre os principais tipos de alimentos e bebidas no qual as reações fotossensibilizadas pelas flavinas têm recebido especial atenção do ponto de vista científico e do ponto de vista prático com relação a embalagens. Leite e derivados se apresentam como um bom veículo para a suplementação de vitaminas hidro e lipossolúveis. Neste caso, dois aspectos em relação à nutrição humana e saúde passam a ser de pontos de interesse: 1) como as flavinas nos alimentos afetam o valor nutritivo de alimentos importantes tais como leite e derivados expostos a luz, e como este efeito no valor nutritivo de macro e micronutrientes pode ser controlado pelo adequado uso de antioxidantes naturais; 2) como as flavinas induzem condições patológicas quando estruturas sensíveis da pele e dos olhos são expostos a radiação luminosa. Neste sentido e com o intuito de investigar qual o principal mecanismo reacional (Tipo I ou II) da fotooxidação das vitaminas do complexo B sensibilizadas por flavinas, reportamos as constantes de velocidade bimoleculares de desativação dos estados singleto e tripleto excitados das flavinas por vitaminas do complexo B, nominalmente ácido fólico, biotina, piridoxal, e niacina.

A **Figura 12** apresenta o espectro eletrônico de absorvidade molar da FMN em solução aquosa de tampão fosfato pH 6,4 com força iônica de 0,16 M. Deve-se notar a presença de uma intensa banda de absorção em comprimento de onda superior a 400nm, região do espectro do visível, de grande importância em termos de fotoestabilidade de alimentos e bebidas.

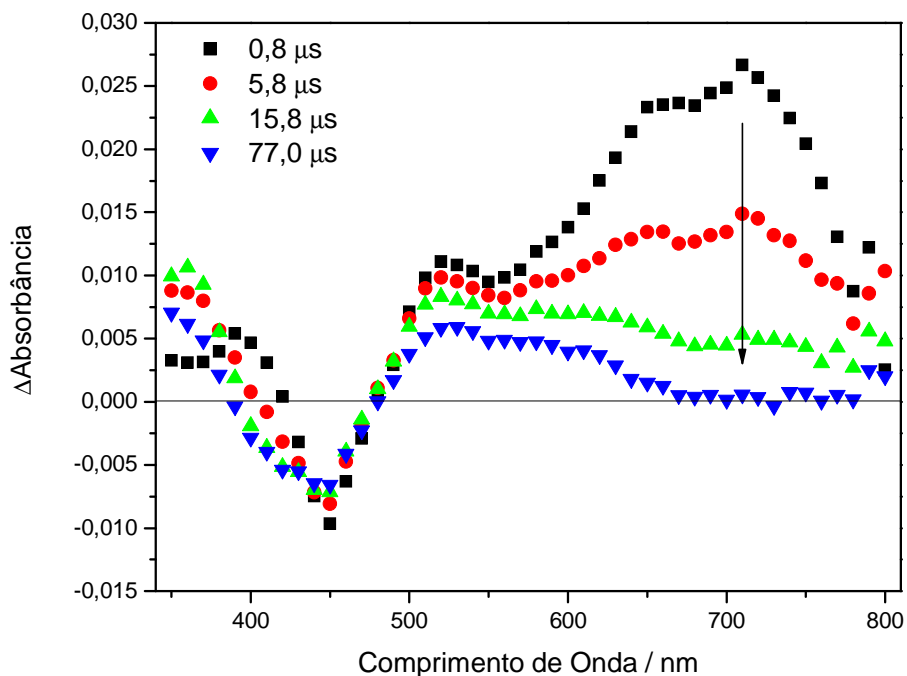


**Figura 12** - Espectro eletrônico da absorptividade molar da FMN  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em solução aquosa tampão fosfato pH 6,4 e força iônica de 0,16 M.



A exposição das flavinas a radiação luminosa na região do visível com luz no azul, veja-se **Figura 8**, promove transições  $\pi - \pi^*$  resultando em estado singlete excitado que através de um eficiente cruzamento intersistemas (ISC),  $\Phi = 0,67$ , origina o estado tripleto excitado, um birradical, com potencial de oxidação de 1,77 V e tempo de vida de 15  $\mu\text{s}$ . A **Figura 13** contém o espectro de diferença de absorbância para o estado tripleto excitado da FMN (transições T-T) registrado com 0,8, 5,8, 15,8, e 77,0  $\mu\text{s}$  de atraso com relação ao pulso de laser de 355 nm (energia  $\approx 14 \text{ mJ/cm}^2$ ) com duração de 8 ns. Este espectro é semelhante ao previamente reportado (CARDOSO *et al.*, 2007 e LU *et al.*, 2004) para o estado tripleto da riboflavina em meio aquoso, apresentando máximos de absorção em 320, 380, 660, 720, e 780 nm e uma região de absorção negativa centrada em 440 nm atribuída ao consumo (*bleaching*) da FMN no seu estado fundamental. Verifica-se pelo espectro apresentado na **Figura 13**, que o máximo de absorção para a transição T-T do estado tripleto das flavinas está centrada em 720 nm e livre de interferência espectral.

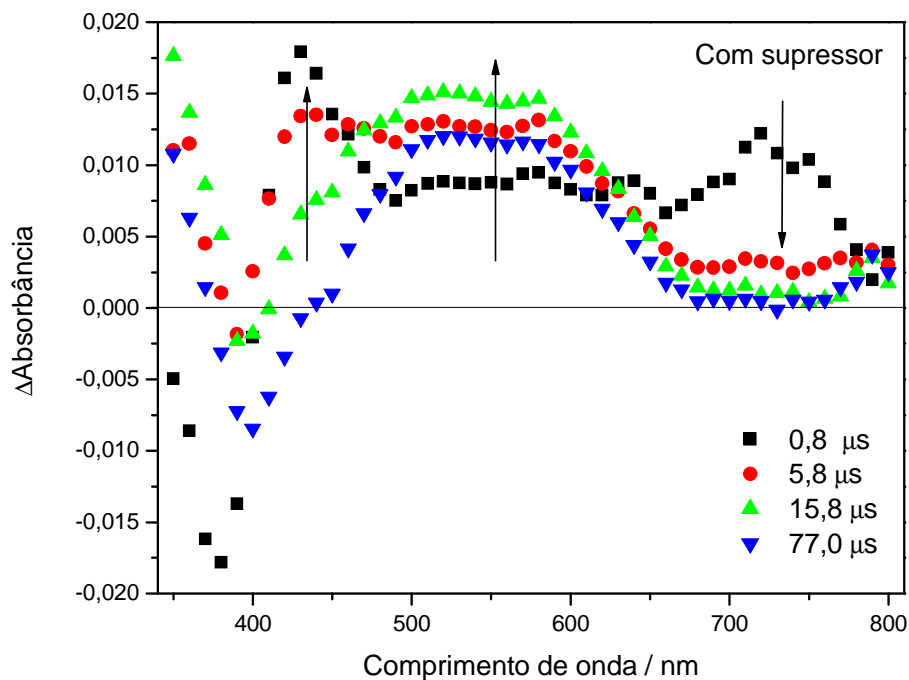
**Figura 13** - Espectro eletrônico da  $\Delta$ Absorbância do estado tripleto excitado da FMN  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  (T-T) registrado  $0,8 \mu\text{s}$ ,  $5,8 \mu\text{s}$ ,  $15,8 \mu\text{s}$  e  $77,0 \mu\text{s}$  após o pulso de laser de  $355 \text{ nm}$  com energia  $\approx 14 \text{ mJ/cm}^2$ .



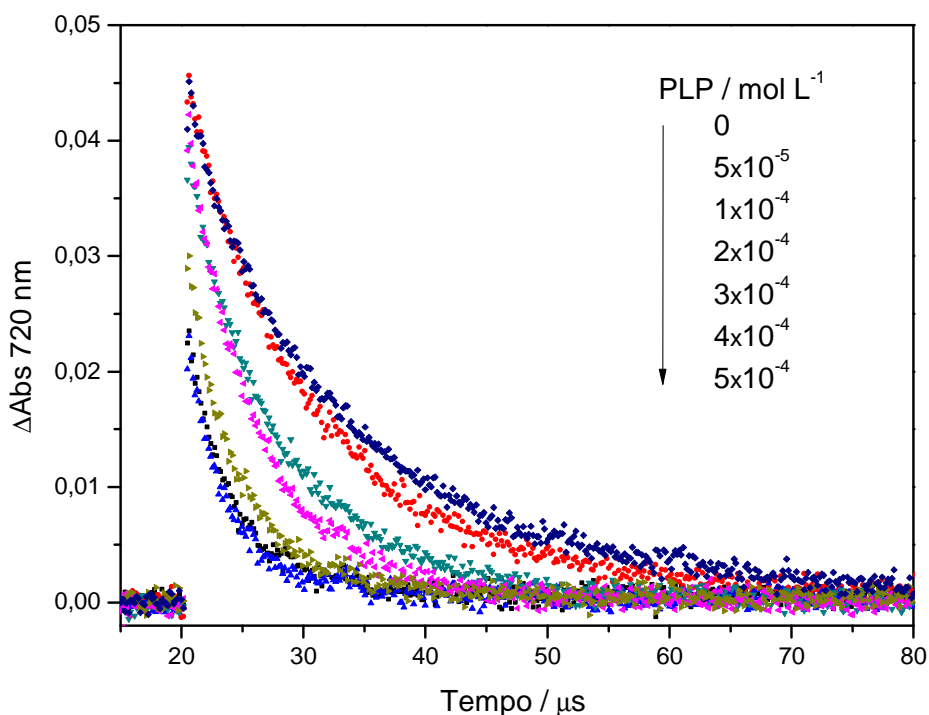
Desta maneira, a desativação do estado tripleto excitado das flavinas pode ser adequadamente investigada por fotólise de pulso de laser com detecção de absorção eletrônica de transientes e monitoramento do estado tripleto excitado em  $720 \text{ nm}$ . A **Figura 14** descreve o espectro da diferença de absorbância do estado tripleto excitado da FMN (T-T) na presença de crescente concentrações de piridoxal-5'-fosfato. Pode ser observado que a adição do piridoxal-5'-fosfato, em condições de pseudo-primeira ordem, promove alterações nas bandas de diferença de absorção em diferentes tempos após o pulso de excitação e que o crescente aumento da concentração do piridoxal-5'-fosfato induz linearmente a um menor tempo de vida do estado tripleto da FMN, **Figura 14** e **15**. É também patente pela análise do espectro eletrônico de transientes, **Figura 14**, o aparecimento de dois diferentes radicais, conforme indicado pelas setas. Uma das espécies possui espectro eletrônico de absorção com banda centrada ao redor de  $430 \text{ nm}$  coincidente com o espectro eletrônico de absorção para radicais cátions derivados da 3-hidroxi-piridina observados por radiólise de pulso. A outra espécie com absorção centrada ao redor

de 560 nm, observa-se formação de ponto isobéstico com a curva de decaimento do estado tripleto excitado, é atribuída a formação do radical neutro da FMN (pKa = 6,8) (LI *et al.*, 2012).

**Figura 14** - Espectro eletrônico da  $\Delta$ Absorbância do estado tripleto excitado da FMN  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  na presença do supressor PLP  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  (T-T) registrado  $0,8 \mu\text{s}$ ,  $5,8 \mu\text{s}$ ,  $15,8 \mu\text{s}$  e  $77,0 \mu\text{s}$  após o pulso de laser de  $355 \text{ nm}$  com energia  $\approx 14 \text{ mJ/cm}^2$ .



**Figura 15** - Curvas de decaimento do estado tripleto excitado da FMN em função da concentração do supressor PLP. Solução aquosa de tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> saturada com N<sub>2</sub> e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo 60 μmol L<sup>-1</sup> de FMN.

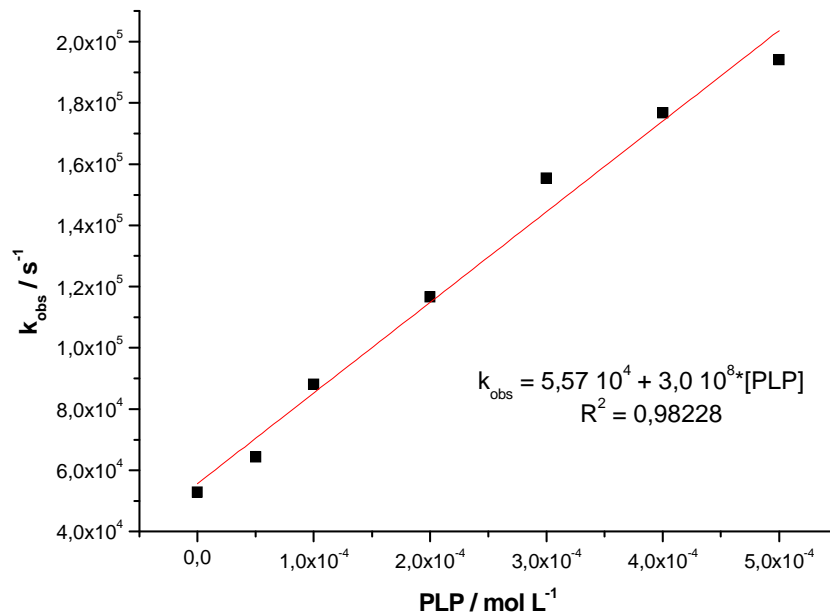


Através da construção do gráfico de constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem do decaimento do estado tripleto monitorado em 720 nm *versus* a concentração do supressor, **Figura 16** e **17**, é possível obter as constantes de velocidade específicas para a desativação do estado tripleto excitado pelo PLP em meio aquoso e de óxido de deutério através do ajuste da equação linear abaixo aos dados experimentais:

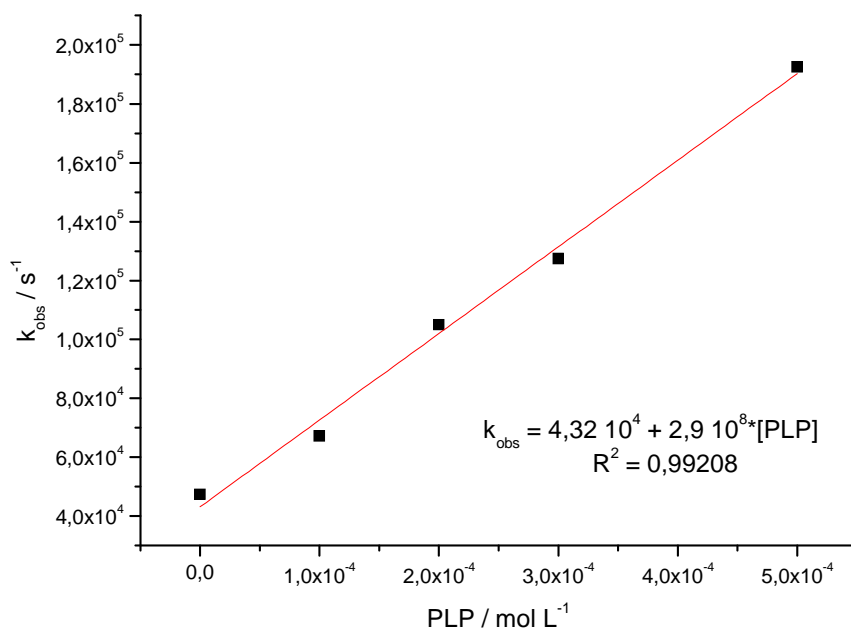
$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_q \cdot [\text{supressor}]$$

onde,  $k_{\text{obs}}$  é a constante observada de pseudo-primeira ordem,  $k_0$  é a constante de velocidade de decaimento natural do estado tripleto metaestável da FMN,  $k_q$  é a constante de velocidade de segunda-ordem específica e  $[\text{supressor}]$  é a concentração molar do supressor.

**Figura 16** - Gráfico de  $k_{obs}$  versus [PLP] em solução aquosa de tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> saturada com N<sub>2</sub> e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo 60 μmol L<sup>-1</sup> de FMN.



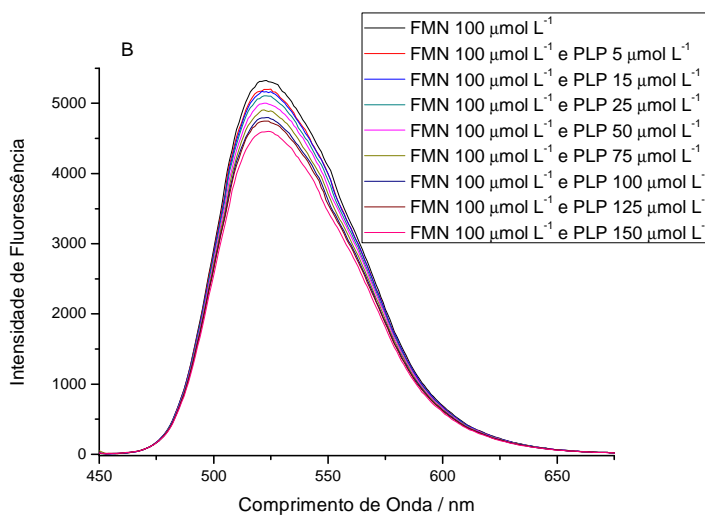
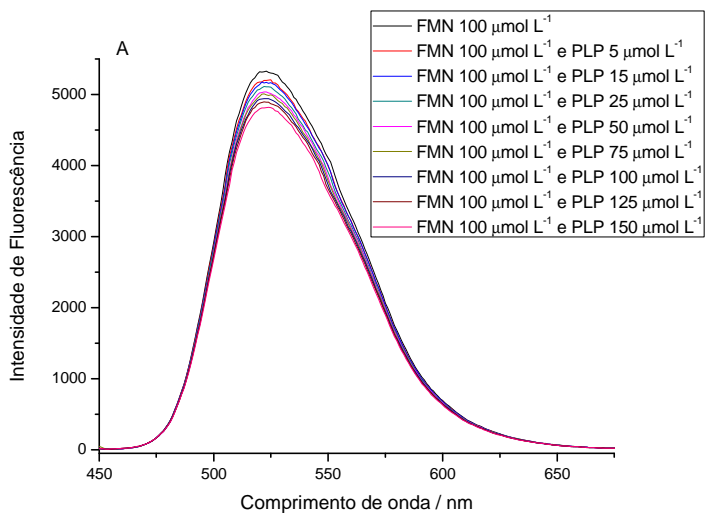
**Figura 17** - Gráfico de  $k_{obs}$  versus [PLP] em solução de tampão fosfato deuterado 20 mmol L<sup>-1</sup> saturada com N<sub>2</sub> e pH ajustado para 6,4 (força iônica = 0,16 M) contendo 60 μmol L<sup>-1</sup> de FMN.



Os valores obtidos experimentalmente para as constantes de velocidade específica foram:  ${}^3k_q = 3,0 \pm 0,1 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para solução em meio aquoso e  ${}^3k_q = 2,9 \pm 0,2 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para solução em meio de óxido de deutério, respectivamente. Estes valores de  ${}^3k_q$  estão próximos ao valor do limite difusional (limite da difusão em meio aquoso é  $k = 7,4 \cdot 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (MUROV, 1993). Não foi observada diferença significativa entre as constantes de desativação do estado tripleto excitado em meio aquoso e de óxido de deutério. A não observância de efeito cinético isotópico pela substituição hidrogênio/deutério corrobora com um processo de transferência direta de elétron do PLP para a  ${}^3\text{FMN}^*$  (CARDOSO *et al.*, 2012). Ao comparar-se a constante de desativação da FMN tripleto excitada pelo PLP com a constante de velocidade de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina por oxigênio molecular ( $9,8 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), verifica-se que ambos processos são cineticamente competitivos e a preferência cinética de um ao outro depende da matriz alimento em termos de teores de PLP, oxigênio dissolvido, e da presença de outros supressores (CARDOSO *et al.*, 2007, BECKER *et al.*, 2005 e CARDOSO *et al.*, 2004). A investigação da desativação do estado tripleto excitado da FMN pela biotina e pela niacina (nicotinamida e ácido nicotínico) revelaram que estas vitaminas não interagem com o estado tripleto excitado da FMN visto que não foi observado a diminuição do tempo de vida do estado tripleto excitado com o aumento da concentração destas vitaminas no meio reacional.

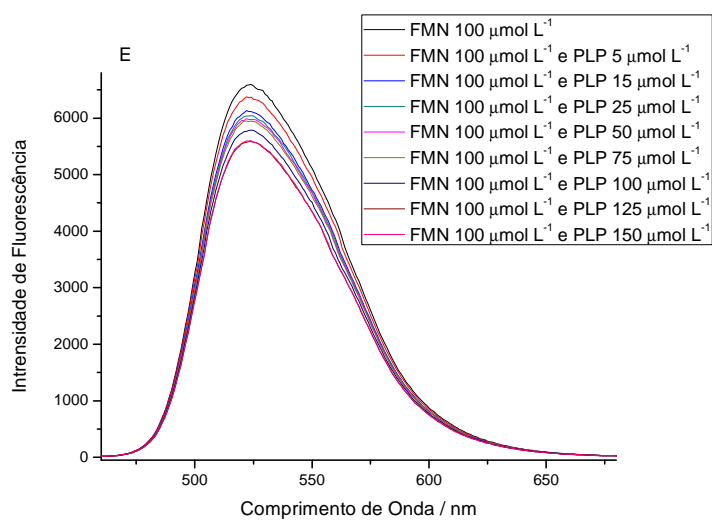
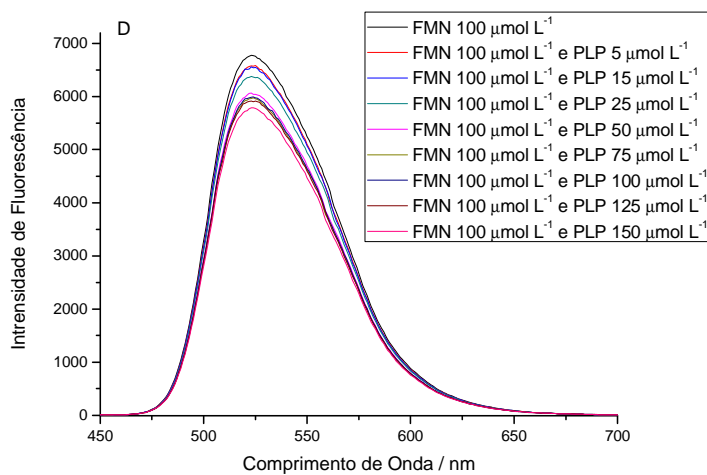
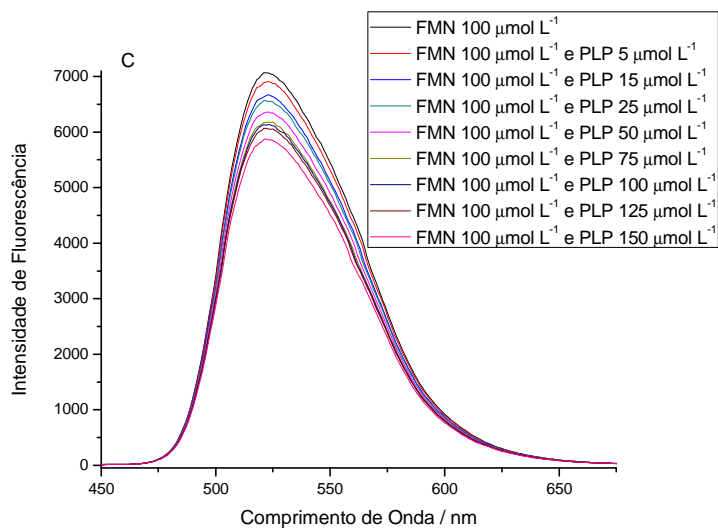
A **Figura 18** ilustra os espectros de emissão molecular da FMN na presença de diferentes concentrações de PLP ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em diferentes condições de pH e de temperatura. Pode ser observada que a intensidade de emissão de fluorescência da FMN singleto excitada diminui linearmente com o aumento da concentração de PLP em solução em todas as condições utilizadas. Entretanto a biotina e a niacina (nicotinamida e ácido nicotínico) não causaram tal efeito, sugerindo que estas vitaminas não interagem com o estado singleto excitado da FMN.

**Figura 18** - Figuras A, B, C, D e E ilustram o espectro de emissão de fluorescência de uma solução aquosa de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de FMN na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato com pH 5,0 a  $25^\circ\text{C}$ , pH 6,4 a  $25^\circ\text{C}$ , pH 7,4 a  $15^\circ\text{C}$ , pH 7,4 a  $25^\circ\text{C}$  e pH 7,4 a  $35^\circ\text{C}$ . Comprimento de onda excitação de 440 nm com largura de fenda de 5 nm e a emissão monitorada em 530 nm com largura de fenda de 5 nm.



(continua)

(conclusão)



Por meio dos valores de intensidade de fluorescência na ausência do supressor ( $I_0$ ) e da intensidade de fluorescência na presença das crescentes



concentrações analíticas do supressor (I) obtidos pelos espectros da **Figura 18**, o gráfico de  $I_0/I$  versus concentração analítica de PLP foi construído, **Figura 19**, e através da equação de Stern-Volmer obteve-se valor experimental da constante de desativação do estado singleto excitado da FMN pelo PLP:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q\tau_0[M] = 1 + K_d[M]$$

onde:

$I_0$  = intensidade de fluorescência na ausência do supressor, onde o supressor é o PLP;

$I$  = intensidade de fluorescência na presença do supressor;

$k_q$  = constante de velocidade bimolecular de desativação do estado singleto excitado;

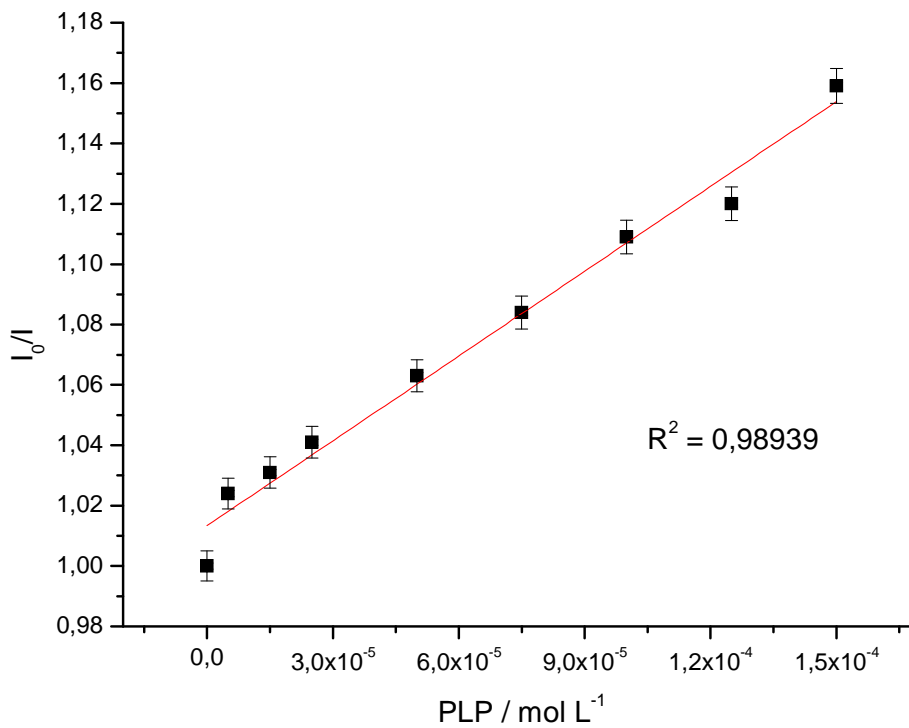
$\tau_0$  = tempo de vida do estado singleto excitado na ausência do supressor;

$[M]$  = a concentração analítica do supressor;

$K_d$  = a constante de supressão dinâmica de Stern-Volmer.

Em decorrência ao fato do PLP absorver parte da fração de radiação luminosa no mesmo comprimento de onda de excitação da FMN, esse fenômeno pode ocasionar uma importante fonte de erros, desta forma a correção do efeito de filtro interno foi realizada considerando a absorção da radiação luminosa com aumento da concentração do supressor para o comprimento de onda de excitação da FMN (GU & KENNY, 2009).

**Figura 19** - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da FMN singleto excitada em tampão fosfato pH 6,4 e força iônica = 0,16 M pelo PLP.



Sabendo-se que o tempo de vida,  $\tau_0$  da FMN singleto excitada é de 5,75 ns (LU *et al.*, 2004) e o valor do coeficiente angular (b) do gráfico de Stern-Volmer, **Figura 19**, obteve-se constante de velocidade bimolecular de desativação ( $^1k_q$ ) do estado singleto excitado apresentados na **Tabela 3**.

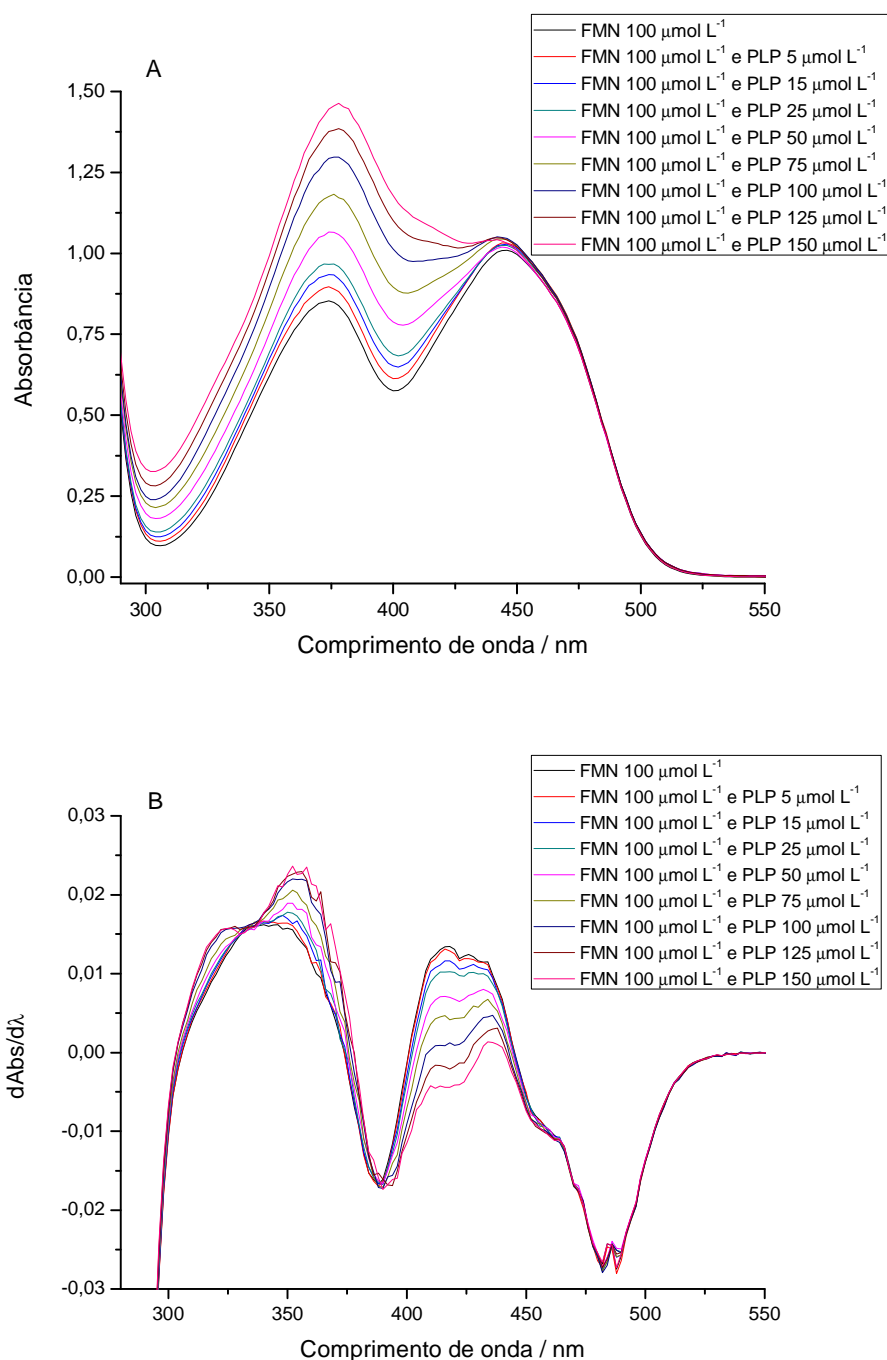
**Tabela 3** - Valores das constantes de velocidade bimoleculares de desativação ( $^1k_q$ ) do estado singleto excitado da FMN pelo PLP em diferentes condições de pH e temperatura.

pH	Temperatura (°C)	$^1k_q$ (L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
5,0	25	$1,2 \pm 0,3 \cdot 10^{11}$
6,4	25	$1,0 \pm 0,1 \cdot 10^{11}$
7,4	15	$2,1 \pm 0,2 \cdot 10^{11}$
7,4	25	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^{11}$
7,4	35	$1,8 \pm 0,2 \cdot 10^{11}$

As alterações de concentração hidrogeniônica do meio não alteram significativamente/sistematicamente os valores das constantes de desativação do estado singleto excitado das flavinas. É observada na **Tabela 3** uma dependência

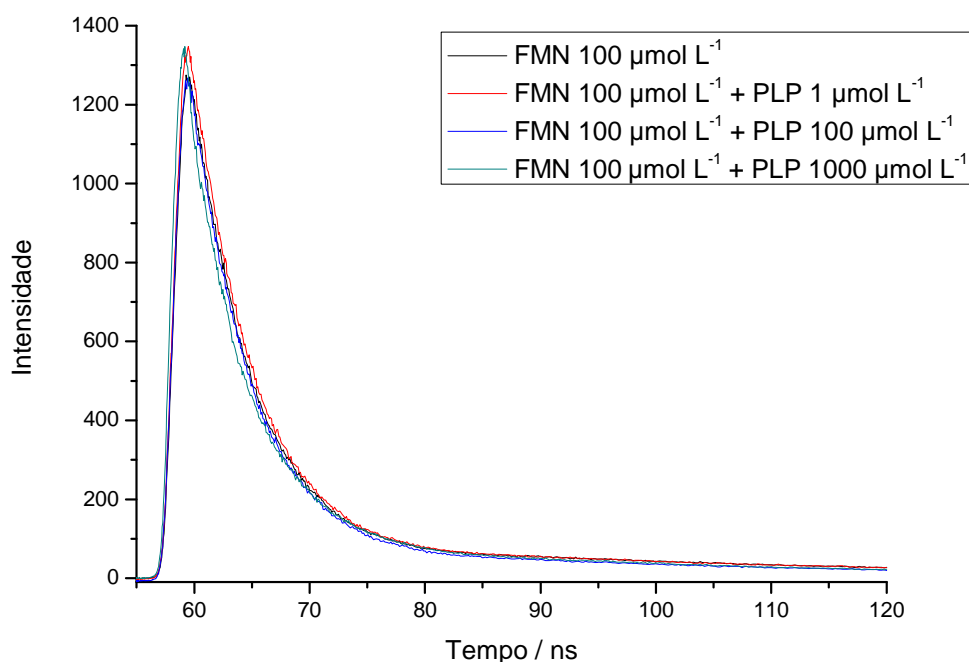
significativa da constante de velocidade com a temperatura, onde o aumento da temperatura leva a um decréscimo da constante de velocidade sugerindo a existência de um complexo [FMN...PLP] no estado fundamental o que também é observado através de pequenas alterações no espectro eletrônico de absorção da FMN na presença de PLP (**Figura 20**).

**Figura 20** - Espectro eletrônico da absorção **(a)** e de sua derivada **(b)** da FMN  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em solução aquosa tampão fosfato pH 6,4 na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato com pH 6,4 e força iônica 0,16 M, respectivamente.



Os valores de constante de velocidade bimolecular de desativação ( $^1k_q$ ) do estado singleto excitado apresentados na **Tabela 3** são superiores ao valor esperado para reações bimoleculares controladas por difusão em meio aquoso e corroboram com o observado efeito da temperatura e a alteração do espectro de absorção eletrônica da FMN na mistura reacional sugerindo a formação de um complexo em solução entre o fluoróforo e o supressor. Este fato foi melhor evidenciado por meio da análise das curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo da FMN na presença de diferentes concentrações de PLP ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), **Figura 21**, onde não se observou alteração significativa no tempo de vida do estado singleto excitado da FMN na presença das crescentes concentrações analíticas do supressor, **Tabela 4**.

**Figura 21** - Decaimento de fluorescência da FMN  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  na presença de PLP em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M)



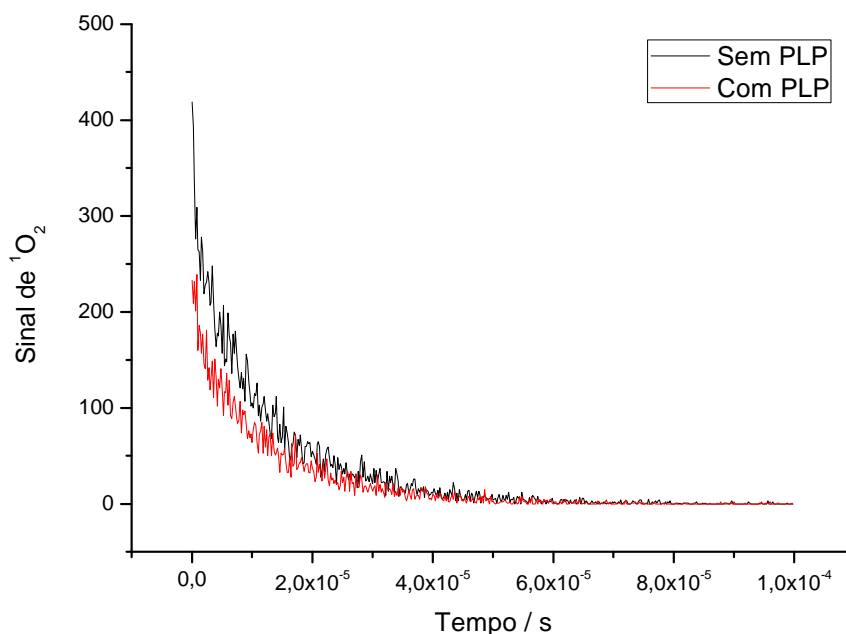
**Tabela 4** - Tempo de vida da FMN 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na presença de diferentes concentrações de PLP em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M)

Amostra	Tempo de Vida / ns
FMN 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5,2 $\pm$ 0,4
FMN 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + PLP 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5,1 $\pm$ 0,6
FMN 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + PLP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,7 $\pm$ 0,2
FMN 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + PLP 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,3 $\pm$ 0,4

Desta forma, as constantes de velocidade de supressão obtidas por espectroscopia de fluorescência estacionária não são resultantes de um processo de desativação dinâmica do estado singleto excitado da flavina, mas sim de uma supressão resultante da provável formação de um complexo no estado fundamental, estático.

No intuito de avaliar a viabilidade do processo de fotooxidação do PLP do Tipo II em comparação ao Tipo I, uma vez que a desativação da FMN pelo PLP e pelo o oxigênio são cineticamente competitivas, foram executados experimentos cinéticos da reatividade do PLP frente ao oxigênio singleto excitado. Os experimentos realizados para se observar a interação do PLP diretamente com o oxigênio singleto demonstraram que há uma desativação do oxigênio singleto excitado pela vitamina (PLP). A **Figura 22** ilustra a curva de decaimento da fosforescência do  $^1\text{O}_2^*$  em função da presença ou ausência de piridoxal-5'-fosfato.

**Figura 22** - Curvas de decaimento do sinal de  $^1\text{O}_2^*$  em 1270nm na ausência e na presença do supressor PLP  $1,26 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em etanol.

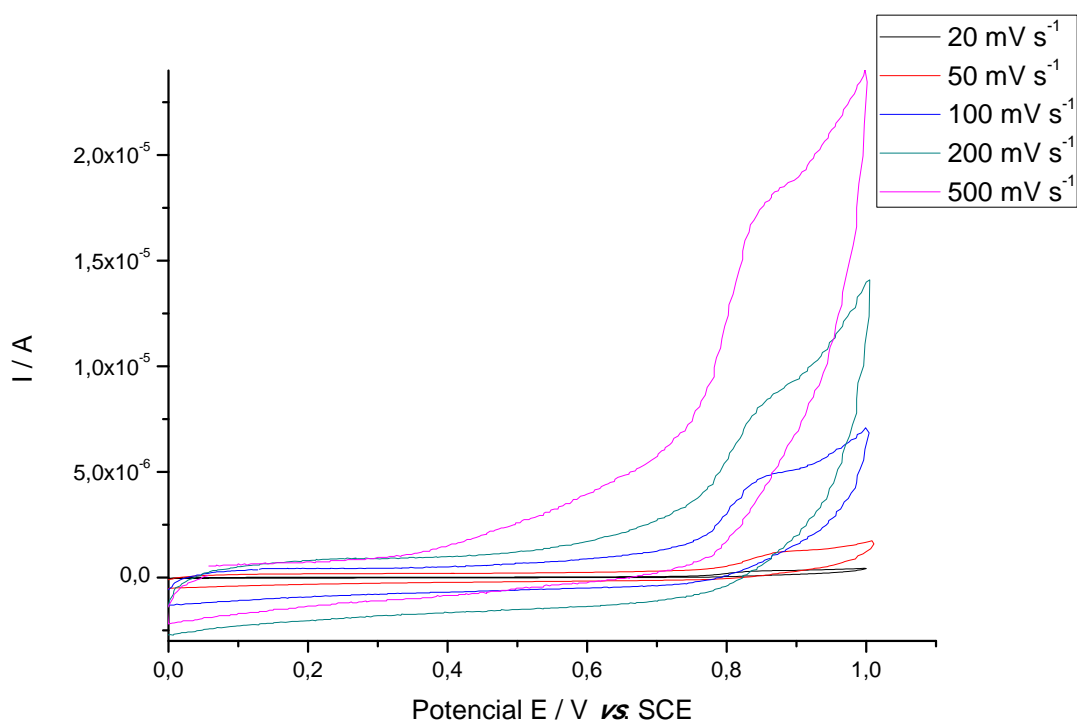


Através das curvas de decaimento da fosforescência do  $^1\text{O}_2^*$ , **Figura 22**, em meio etanólico, obteve-se a constante de velocidade observada  $k_{\text{obs}} = 9,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  para o decaimento do oxigênio singlete excitado na presença de  $1,26 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de PLP. A constante de velocidade da reação  $k_q$  é  $7,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  próximo do reportado para a base livre piridoxina  $k_q = 3,45 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  em etanol (BILSKI *et al.*, 2000). Este valor de constante de velocidade para a desativação do oxigênio singlete excitado não é competitivo na grande maioria da matriz alimento em termos da reatividade do oxigênio singlete excitado frente a proteínas e lipídeos insaturados ( $k \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $k \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (RONSEIN *et al.*, 2006) respectivamente).

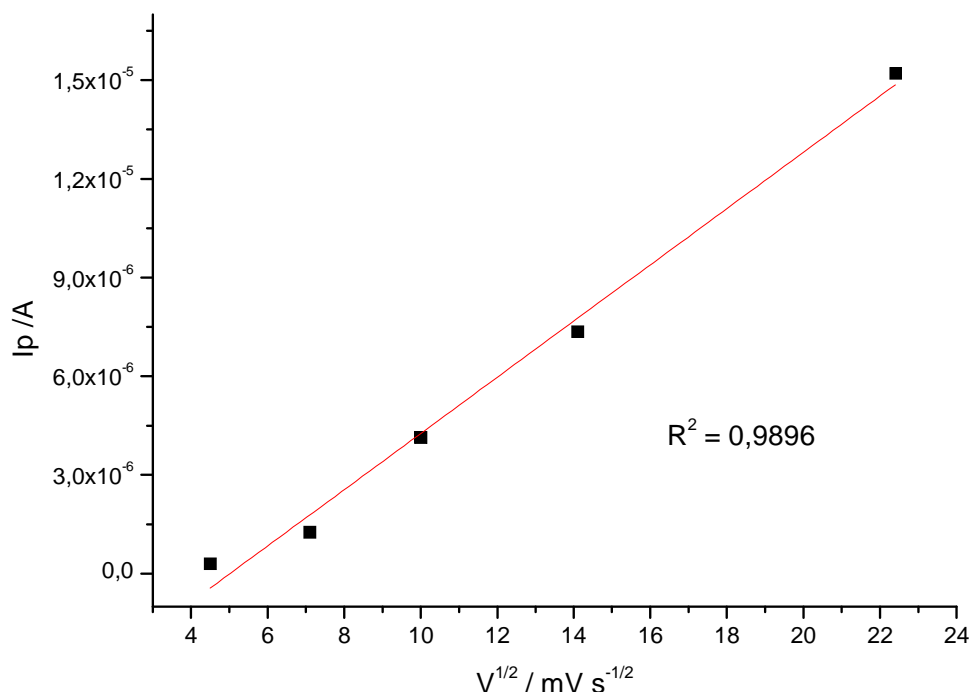
Com vistas a um melhor entendimento do processo de desativação dos estados excitados das flavinas pelas vitaminas investigadas, transferência de elétrons (ET) versus transferência de átomo de hidrogênio (HAT), e da ausência de reatividade frente as vitaminas B3 e B7 foram determinados os potenciais redox das vitaminas biotina, piridoxal-5'-fosfato e niacina através de experimentos de voltametria cíclica. Dentre as vitaminas investigadas, apenas o piridoxal-5'-fosfato se apresentou eletro-ativa na janela de potencial investigada (0,0 a 1,1 *versus* SCE).

A **Figura 23** contém os voltamogramas cíclicos obtidos com diferentes velocidades de varredura (20, 50, 100, 200 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ ) para o PLP em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M). A análise da **Figura 23** sugere a presença de uma onda anódica para o processo de oxidação do PLP em 0,83 V *versus* SCE. A ausência de onda na varredura catódica nesta janela de potencial sugere um processo de oxidação irreversível. A fim de verificar o processo que ocorre na superfície do eletrodo foi construído um gráfico da corrente de pico anódico *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura, o qual pode ser encontrado na **Figura 24**.

**Figura 23** - Voltamogramas cíclicos do PLP  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M) utilizando os seguintes eletrodos: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). As velocidades de varredura utilizadas foram: 20, 50, 100, 200 e 500  $\text{mV s}^{-1}$ .



**Figura 24** - Corrente de pico anódica *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura da solução de PLP  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 6,4 (força iônica = 0,16 M).



Através da leitura da **Figura 24**, verifica-se uma dependência linear da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade, evidenciando um processo difusional, cujo transporte de massa na oxidação do PLP é controlado cineticamente por transferência heterogênea de elétrons do substrato para o eletrodo.

Com a finalidade de se obter informações sobre a transferência de elétrons procurou-se obter dados termodinâmicos. A diferença de energia padrão de Gibbs,  $\Delta G^{\circ}$ , para uma reação de transferência de elétrons é expressa pela equação de Rehm-Weller:

$$\Delta G^{\circ} = 96,48 (E_{\text{ox}}^{\text{D}} - E_{\text{red}}^{\text{A}} - e^2/\epsilon_a) - \Delta E_{0,0}$$

onde os termos mais importantes estão relacionados ao potencial de ionização do doador ( $E_{\text{ox}}^{\text{D}}$ ), a afinidade eletrônica do aceitador ( $E_{\text{red}}^{\text{A}}$ ); o fator coulômbico em função do solvente ( $e^2/\epsilon_a$  = termo coulômbico que pode ser negligenciável em



solventes com alta constante dielétrica). A diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental da riboflavina  $\Delta E_{0,0}$ :

para o estado singleto, o valor de  $\Delta E_{0,0} = 239,3 \text{ KJ mol}^{-1}$  (LU *et al.*, 2004);

para o estado tripleto, o valor de  $\Delta E_{0,0} = 208,2 \text{ KJ mol}^{-1}$  (LU *et al.*, 2004);

O potencial de oxidação do PLP foi obtido através de dados de voltametria cíclica utilizando-se como eletrodo de referência de calomelano saturado, porém o potencial obtido foi convertido à escala de referência de hidrogênio para sua utilização nos cálculos de  $\Delta G^\circ$ . O potencial de redução da riboflavina foi retirado da literatura (LU *et al.*, 2004).

$$E_{\text{ox}} = 1,07 \text{ V vs NHE (PLP)}$$

$$E_{\text{red}} = - 0,29 \text{ V vs NHE (FMN)}$$

Com os dados acima calculou-se os valores de  $\Delta G^\circ$ :

$$\Delta G^\circ_{\text{ET-S}} = - 107,9 \text{ KJ mol}^{-1}$$

$$\Delta G^\circ_{\text{ET-T}} = - 76,8 \text{ KJ mol}^{-1}$$

Quando uma reação é bastante exergônica ( $\Delta G^\circ \ll 0$ ), pode-se assegurar que a transferência de elétrons ocorrerá com uma alta constante de velocidade; em uma reação endergônica ( $\Delta G^\circ \gg 0$ ), pode-se eliminar a possibilidade de transferência eletrônica (admitindo-se o caso de transferência de elétrons por esfera externa) (ROCHA & TOMA, 2002). Os valores negativos de  $\Delta G^\circ$  obtidos indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente tanto para o processo de desativação do estado singleto excitado como para o tripleto. Entretanto, para o PLP não é observada reação, transferência de elétrons e/ou carga, do estado singleto excitado da FMN para o PLP e apesar do valor negativo para o valor de variação da energia de Gibbs para o processo, cineticamente esta desativação não é competitiva com o processo de ISC ( $k_{\text{ISC}} = 2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ) (LI & GLUSAC, 2008). A biotina e niacina (nicotinamida e ácido nicotínico) não apresentaram potenciais de oxidação na janela de varredura estudada, o que sugere que elas possuam altos potenciais de oxidação,  $E^\circ > 2 \text{ V vs. NHE}$  confirmando que elas não suprimem o estado singleto e tripleto excitados da FMN. Outro fato em favor do processo de desativação do estado tripleto das flavinas por direta transferência de elétrons (ET) do PLP para a  $^3\text{FMN}^*$  é quando se leva em consideração o alto valor de BDE (kJ/mol) para as ligações C-H do grupo aldeído e para a ligação O-H do álcool ligado na posição 3 do anel piridínico de 389,5 e 393,9

kJ/mol respectivamente (BRINKEVICH et al., 2011). Valores estes de BDE não favoráveis a um processo cinético eficiente para o mecanismo de HAT (Afinidade por átomo de hidrogênio da  $^3\text{FMN}^*$  é de  $4 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) como anteriormente observado para o ácido oleico (CARDOSO *et al.*, 2012).

Em adição aos dados cinéticos e termodinâmicos sugerindo o mecanismo do Tipo I como predominante para a fotodegradação do PLP sensibilizada pela FMN, foram coletados dados referentes ao rendimento quântico deste fotoprocessos em condições aeróbicas e anaeróbicas bem como substituindo-se o meio aquoso pelo meio de óxido de deutério.

Desta forma, utilizou-se o método actinométrico para o cálculo da intensidade do fluxo de radiação da lâmpada, para se determinar o rendimento quântico.

O valor médio da intensidade da radiação luminosa calculada para os experimentos de fotólise contínua foi de  $3,36 \cdot 10^{-8} \text{ Einstein min}^{-1}$ .

Após determinar-se o valor da intensidade da luz incidente, calculou-se o número de fótons, o qual é dado pela equação:

$$\text{n}^\circ \text{ de fótons} = \text{Intensidade da radiação luminosa} \times \text{tempo de irradiação da amostra (minutos)}$$

Desta maneira, a determinação quantitativa do teor de PLP remanescente após a fotólise da solução na presença de FMN durante 15 minutos, com irradiação luminosa em 440 nm, permitiu o cálculo do rendimento quântico de degradação do PLP sensibilizado pela FMN, utilizando-se da equação:

$$\Phi = \frac{\text{número de mols que reagem por unidade de volume e tempo}}{\text{número de fótons absorvidos por unidade de volume e tempo}}$$

Os valores obtidos de rendimento quântico de fotodegradação do PLP sensibilizado pela FMN encontram-se na **Tabela 5**.

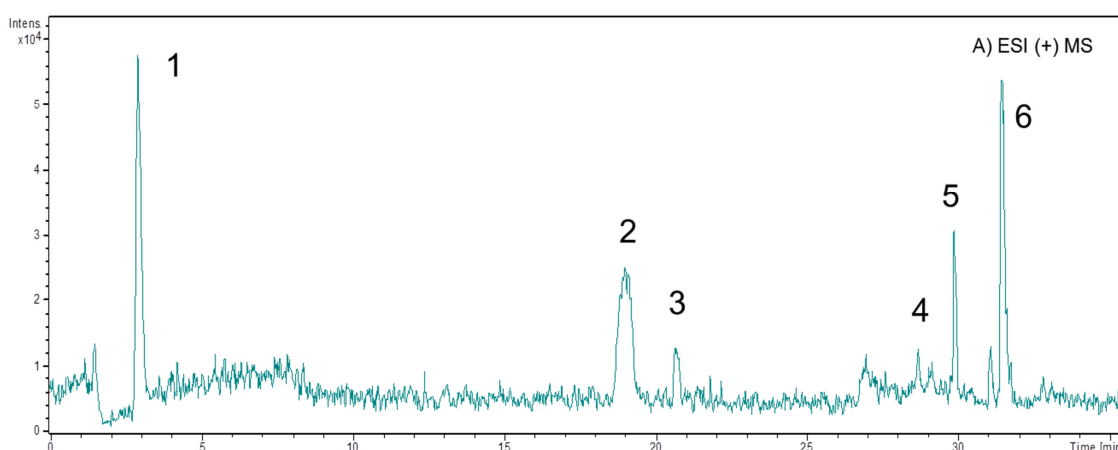
**Tabela 5** - Rendimento quântico obtido pela fotólise da solução de PLP e FMN

$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Com $\text{O}_2$	$\Phi_{\text{D}_2\text{O}}$ Com $\text{O}_2$	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Sem $\text{O}_2$
$0,82 \pm 0,11$	$0,78 \pm 0,12$	$0,33 \pm 0,13$

Ao se comparar os rendimentos quânticos para a fotodegradação sensibilizada do PLP induzida por flavinas em meio aquoso na presença e ausência de oxigênio observa-se uma diferença significativa. O rendimento quântico de fotodegradação em meio aerado é 2,5 vezes superior ao encontrado para a reação em meio anaeróbico. Na presente condição experimental ( $[FMN] = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $[PLP] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) sugere a condição predominante como sendo a fotogeração de oxigênio singleto excitado. No entanto, quando da realização do experimento em meio aerado de óxido de deutério, não se observa uma diferença significativa no rendimento quântico de fotodegradação ao contrário do esperado pela reatividade do PLP frente ao  $^1O_2^*$  e do seu maior tempo de vida em meio deuterado. Este fato pode em parte ser explicado por maior contribuição da reação entre PLP e o íon superóxido gerado no processo de regeneração (redução) do radical neutro da FMN a FMN e da competição da FMN pelo oxigênio singleto excitado ( $k = 9,8 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (CARDOSO *et al.*, 2012).

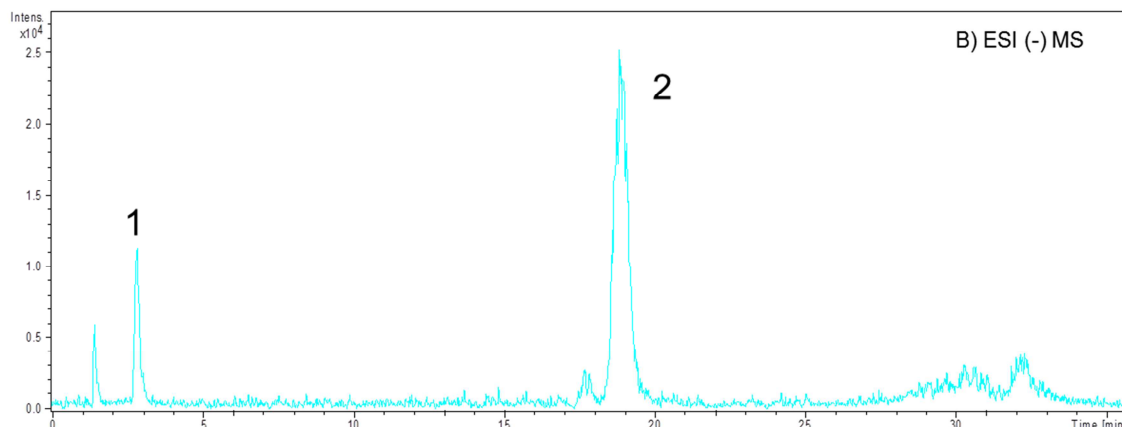
A identificação dos principais produtos formados a partir da fotodegradação do PLP sensibilizado pela FMN (**Figura 25**) foi investigada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de múltiplo estágio (LC-ESI-MS/MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI).

**Figura 25** - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de PLP e FMN operando nos modos de detecção **A**) positivo **B**) negativo.



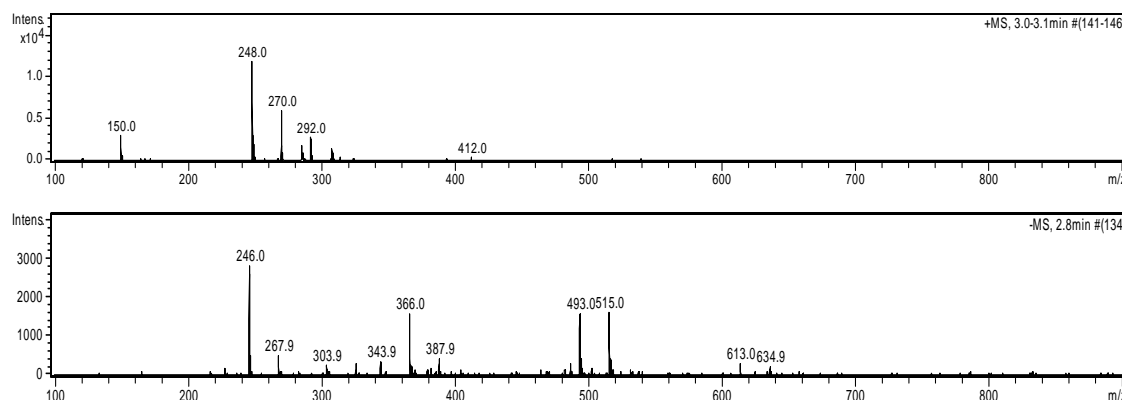
(continua)

(conclusão)

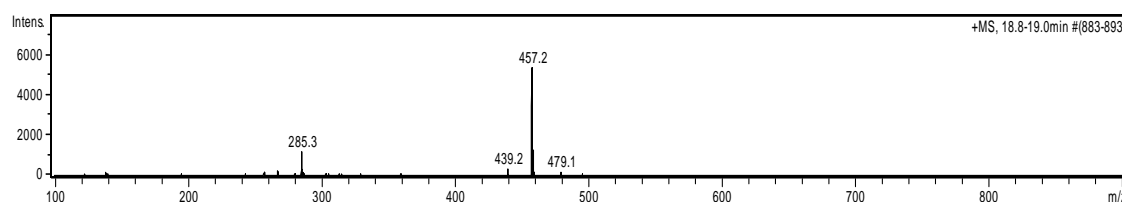


**Figura 26 - Pico 1** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). **Pico 2** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). **Pico 3** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). **Pico 4** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). **Pico 5** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A). **Pico 6** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 25, nos modos de detecção positivo (A).

### Pico 1

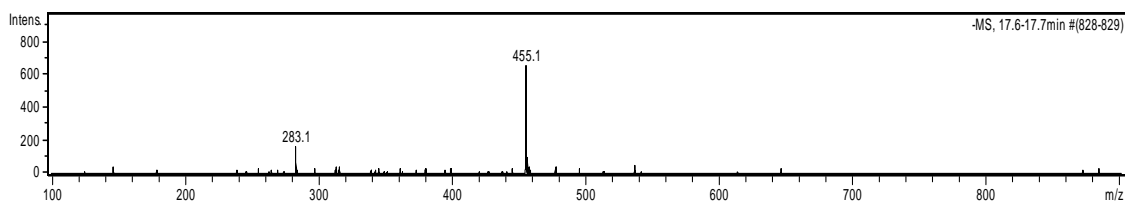


### Pico 2

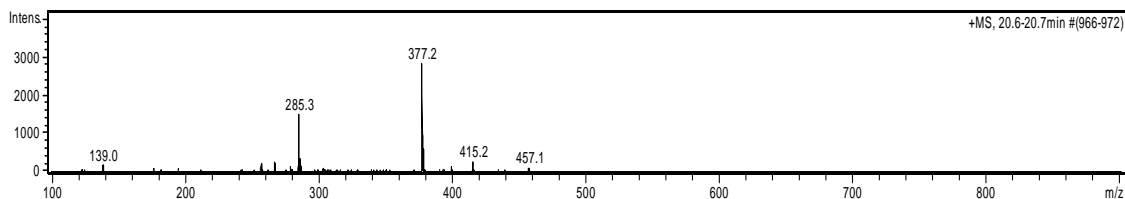


(continua)

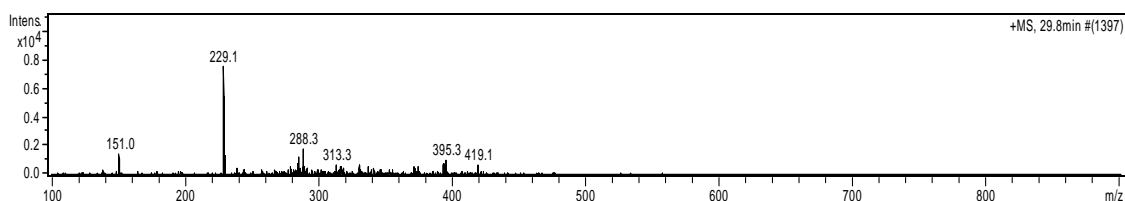
(conclusão)



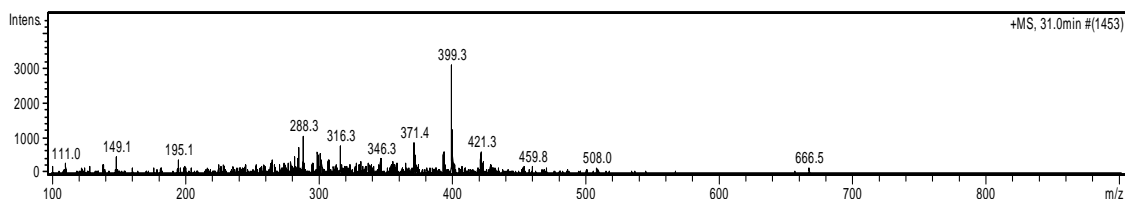
### Pico 3



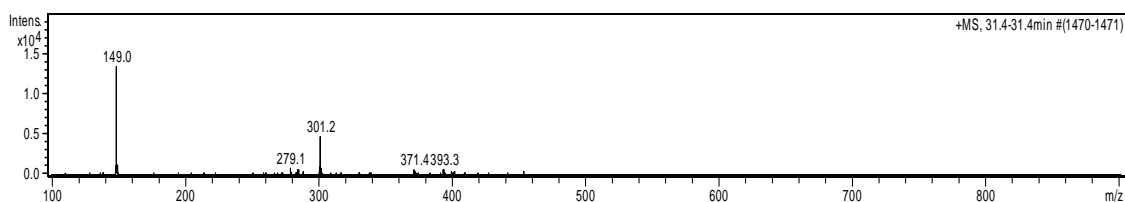
### Pico 4



### Pico 5



### Pico 6



A análise da **Figura 26-1**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 1 o qual apresenta  $t_r = 3,0$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 248$  e  $[M-H]^-$  com  $m/z = 246$  sugerindo a presença de um composto com massa molecular de 247 Da referente ao PLP. Ainda no espectro de massas, modo positivo, do pico 1 observa o íon com  $m/z = 270$  referente ao aduto de sódio do PLP  $[M+Na]^+$  e o íon com  $m/z = 493$ , no modo negativo, a referente ao

dímero  $[2M-H]^-$  e a presença do dímero com ponte de sódio  $[2M-2H+Na]^-$  em 515 m/z.

A análise da **Figura 26-2**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 2 o qual apresenta  $t_r = 19,0$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 285$  e  $[M-H]^-$  com  $m/z = 283$  sugerindo a presença de um composto com massa molecular de 284 Da referente a um fragmento fotogerado na degradação da FMN, formil-lumiflavina (CARDOSO *et al.*, 2006). A existência do íon pseudo-molecular  $[M+H-H_2O]^+$  com  $m/z = 439$  referente a perda de água da FMN e dos íon pseudo-moleculares  $[M+H]^+$  com  $m/z = 457$  e  $[M-H]^-$  com  $m/z = 455$  sugerem a presença de um composto com massa molecular de 456 Da referente a FMN. O íon pseudo-molecular  $[M+Na]^+$  com  $m/z = 479$  é assinalado como aduto de sódio da FMN.

A análise da **Figura 26-3**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 3 o qual apresenta  $t_r = 21,0$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 377$ , sugerindo a presença de um composto com massa molecular de 376 Da referente à riboflavina (CARDOSO *et al.*, 2006).

A análise da **Figura 26-4**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 4 o qual apresenta  $t_r = 30,0$  minutos, revela a existência dos íon pseudo-moleculares com  $m/z = 151$  e 229 que sugerem a presença de compostos com massa molecular de 150, 228 Da respectivamente.

A análise da **Figura 26-5**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 5 o qual apresenta  $t_r = 31,0$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+Na]^+$  com  $m/z = 399$  assinalado como aduto de sódio da riboflavina (CARDOSO *et al.*, 2006).

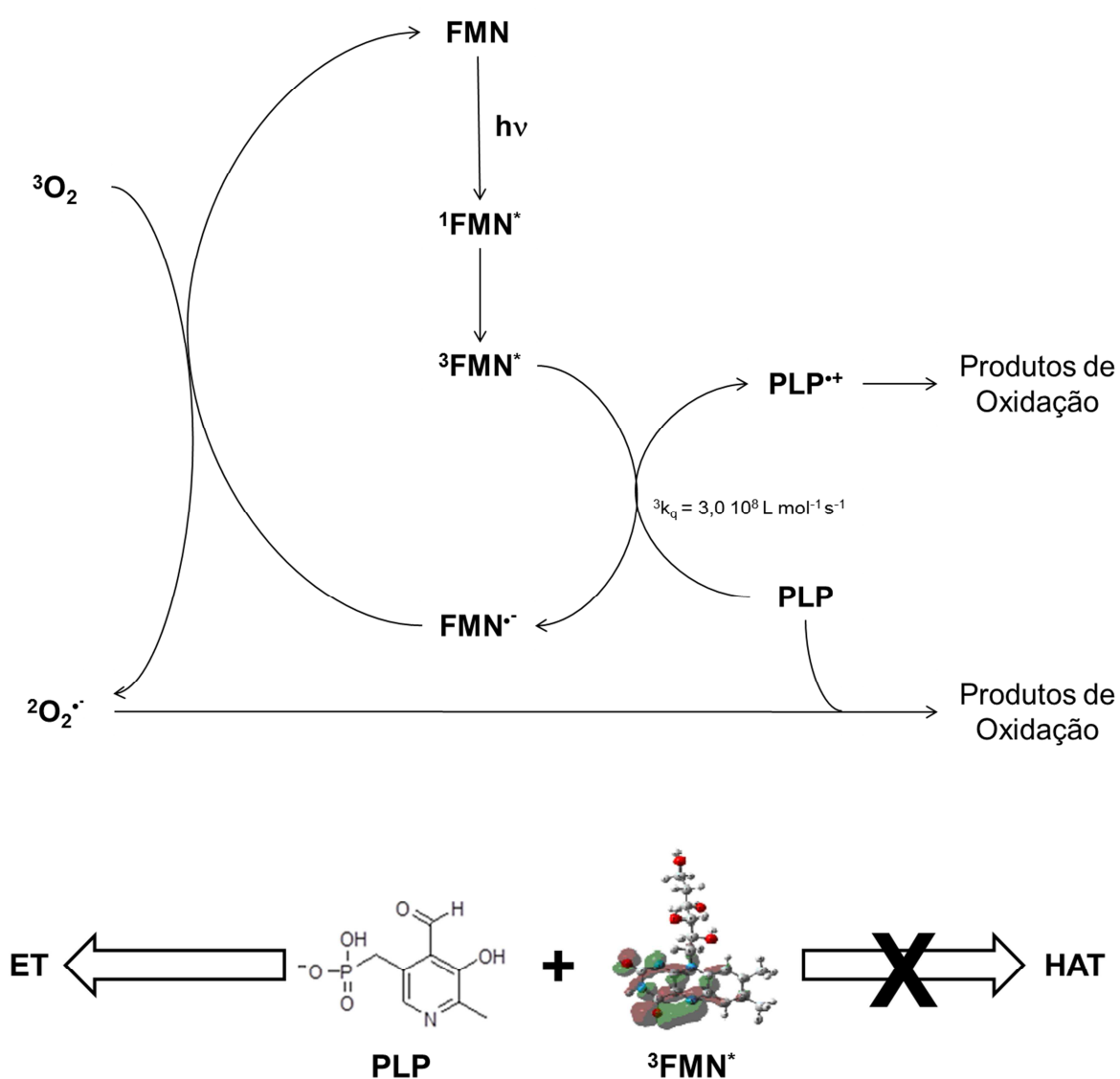
A análise da **Figura 26-6**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 6, o qual apresenta  $t_r = 32,0$  minutos, revela a existência dos íons pseudo-moleculares com  $m/z = 149$ , 279 e 301 que sugerem a presença de compostos com massas moleculares de 148, 278 e 300 Da respectivamente.

Entretanto, devido à falta de informações após se analisar os dados dos fragmentos obtidos, não foi possível atribuir possíveis estruturas químicas para os compostos referente aos picos 4 e 6. Entretanto apenas o pico 4 pode ser considerado como provável fotoproduto da oxidação do PLP induzida por luz e sensibilizada por flavinas já que o pico 6 é recorrente na fotólise de soluções de

ácido fólico na presença de FMN. Desta forma, não foi possível a atribuição da estrutura dos principais fotoprodutos do PLP e estudos nesta direção devem ser realizados com o auxílio da técnica de HPLC-SPE-RMN.

Contudo, com todos os dados obtidos, foi possível sugerir uma proposta para a degradação do piridoxal-5'-fosfato em matrizes alimentos e em meio de baixa  $P_{O_2}$ , o qual pode ser encontrado no **Esquema 1**.

**Esquema 1** - Esquema ilustrativo para a proposta de degradação do piridoxal-5'-fosfato em matrizes alimentos e em meio de baixa  $P_{O_2}$  induzida por luz e sensibilizado por flavinas.



## 4.2. Estudo da fotodegradação de folatos sensibilizados por flavinas na presença de beta-lactoglobulina

É reportado na literatura a instabilidade fotooxidativa do ácido fólico induzida por luz e sensibilizada por flavinas. Liang & Subirade (2010) recentemente reportaram investigação sobre a interação entre o ácido fólico e a proteína  $\beta$ -LG e o impacto positivo da complexação na fotoestabilidade do ácido fólico, porém na ausência de fotossensibilizador. O ácido fólico liga-se a superfície da  $\beta$ -LG com constante,  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  ( $n = 2$ ), em outras palavras interação de força mediana e possivelmente na depressão em espiral próxima a  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha da proteína (LIANG & SUBIRADE, 2010).

A fim de propiciar um melhor conhecimento sobre o provável aumento na fotoestabilidade do ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG (razão molar de 2:1) foram realizados experimentos referentes ao rendimento quântico deste fotoprocessos em condições aeróbicas e anaeróbicas e comparados com experimentos realizados anteriormente da fotólise do ácido fólico sem a adição de  $\beta$ -LG reportados por Scurachio *et al.* (2011), **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Rendimento quântico de fotodegradação do ácido fólico e do ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG sensibilizado por flavinas.

$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Com $\text{O}_2$ (AF+ $\beta$ -LG)	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Sem $\text{O}_2$ (AF+ $\beta$ -LG)	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Com $\text{O}_2$ (AF)	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$ Sem $\text{O}_2$ (AF)
0,032	0,055	0,26	0,32

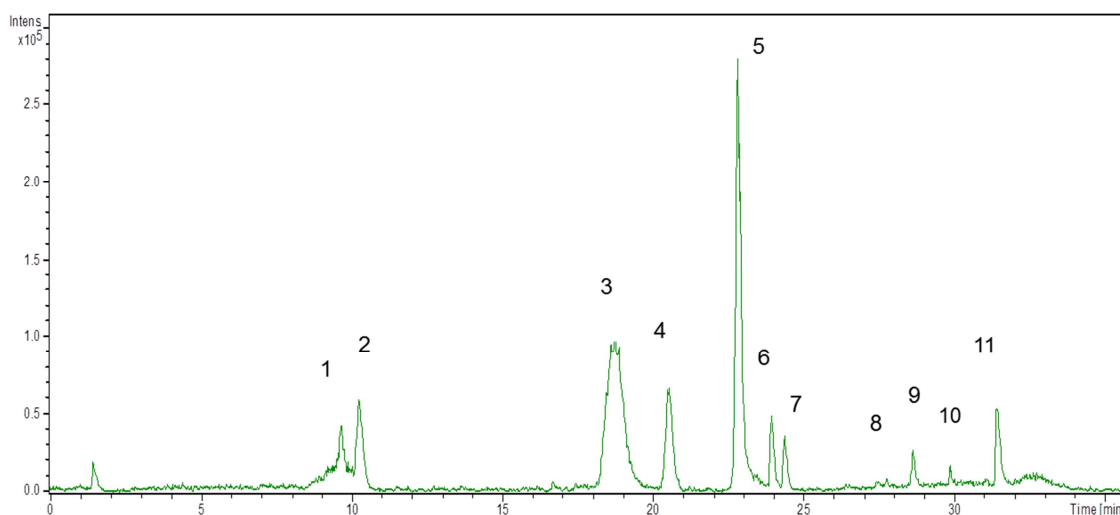
Através da análise crítica da **Tabela 6** fica patente a proteção do ácido fólico frente a fotooxidação sensibilizada por flavinas quando de sua complexação pela proteína, demonstrado através da redução em 8 vezes em solução aeróbica e de 6 vezes na ausência de oxigênio. Esta observação é de extrema relevância para química de alimentos visto que demonstra a aplicabilidade de leite e produtos lácteos como veículos para a suplementação com ácido fólico, além de sugerir o encapsulamento desta vitamina na matriz  $\beta$ -LG como técnica de promover a fotoestabilidade e incorporação da vitamina em diversos produtos alimentícios.

A identificação dos principais produtos formados a partir da fotodegradação do ácido fólico complexado à  $\beta$ -LG sensibilizado pela FMN (**Figura 27**) também foi



realizada por análise da solução fotodegradada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de múltiplo estágio (LC-ESI-MS/MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) a fim de verificar se são formados fotoprodutos semelhantes aos reportados Scurachio *et al.* (2011).

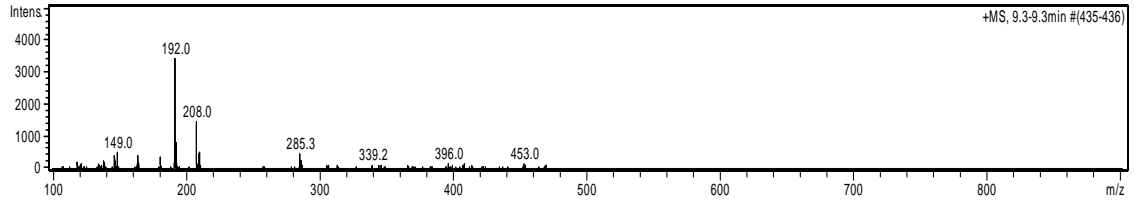
**Figura 27** - Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG e FMN operando no modo de detecção positivo.



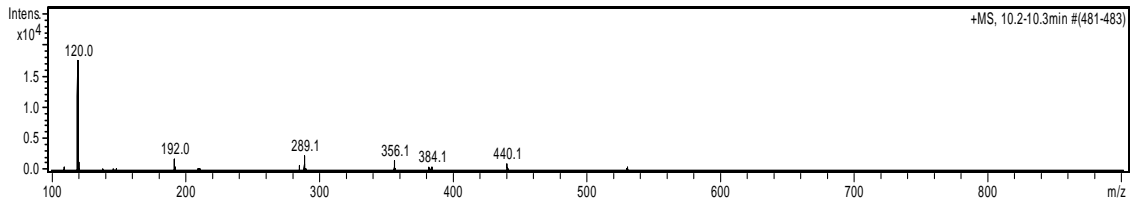
**Figura 28** - **Pico 1** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 2** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 3** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 4** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 5** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 6** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 7** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 7 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 8** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 8 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 9** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 9 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 10** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 10 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo. **Pico 11** - Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 11 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 27, nos modos de detecção positivo.

(continua)

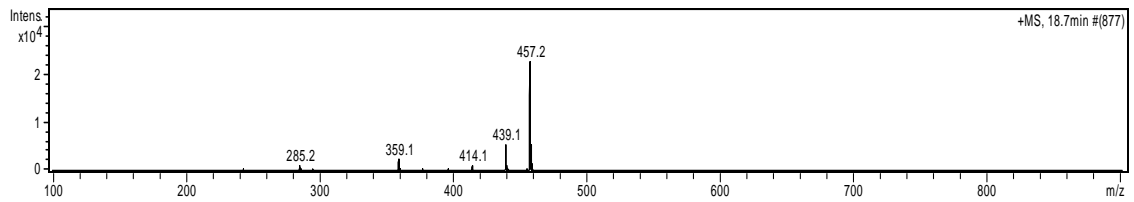
### Pico 1



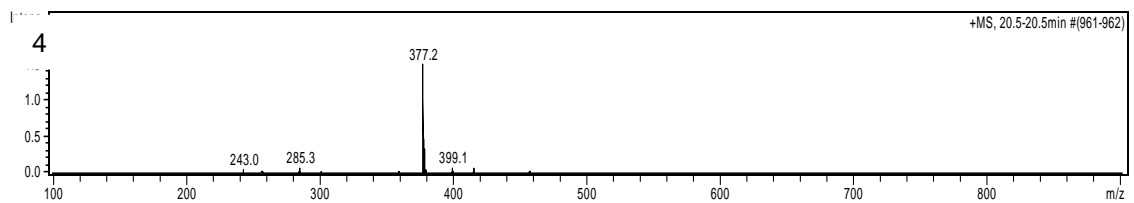
### Pico 2



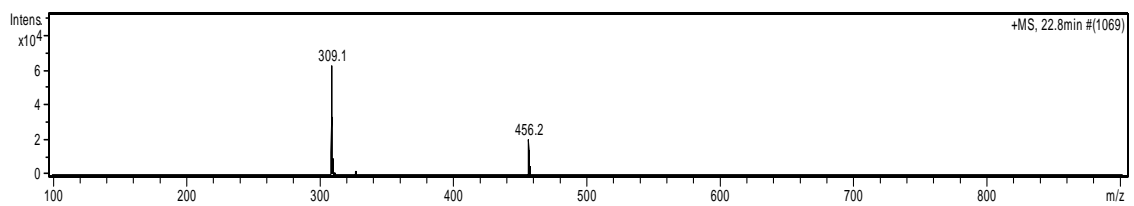
### Pico 3



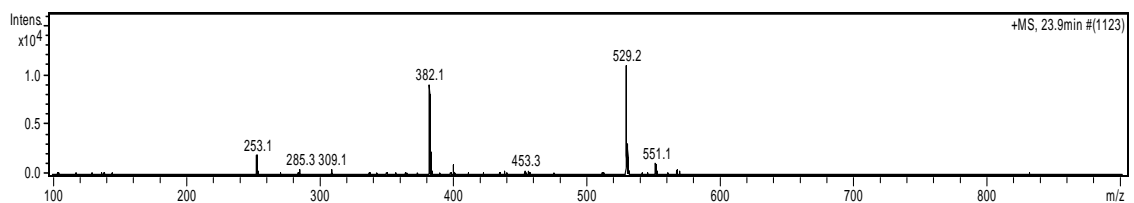
### Pico 4



### Pico 5



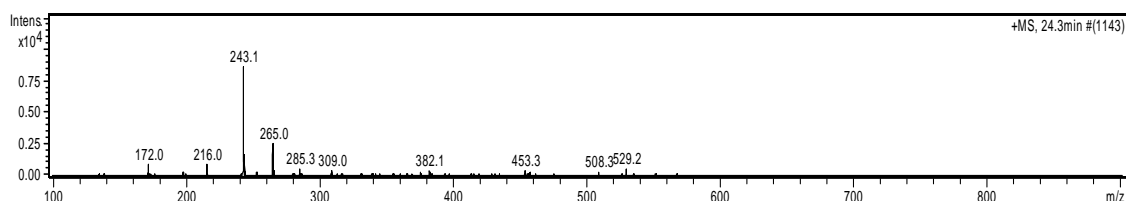
### Pico 6



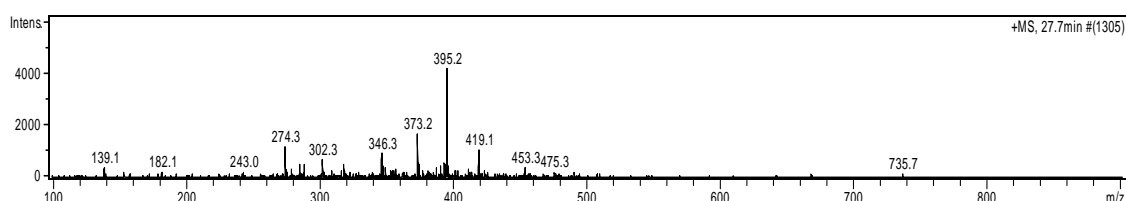
(continuação)

(conclusão)

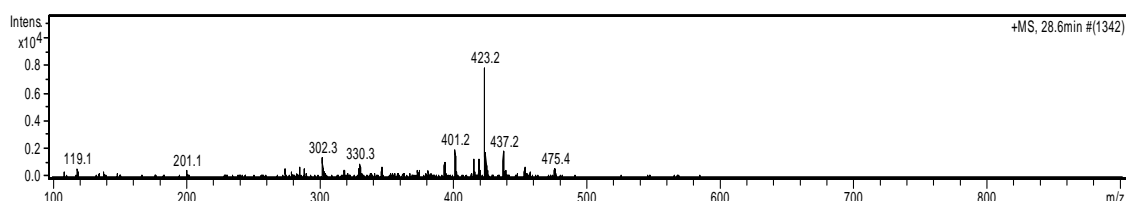
### Pico 7



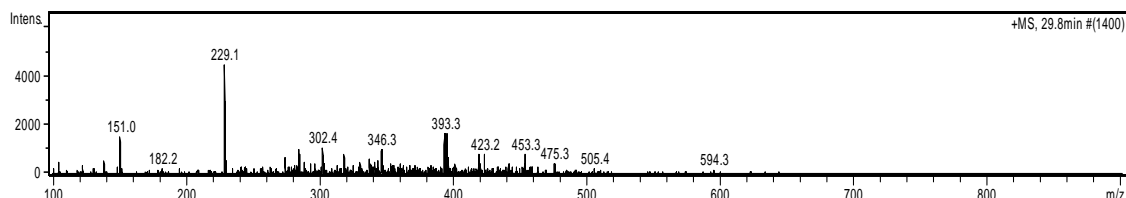
### Pico 8



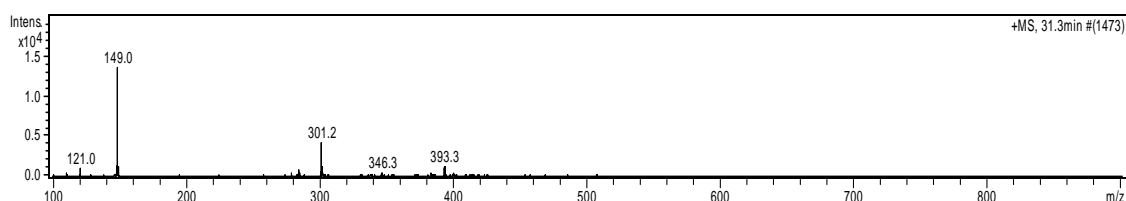
### Pico 9



### Pico 10



### Pico 11



A análise da **Figura 28-1**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 1 o qual apresenta  $t_r = 9,3$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 208$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 207 Da referente a 6-carboxipterina, fotoproducto do ácido fólico. O íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 192$  trata-se de um fragmento da própria 6-carboxipterina (SCURACHIO *et al.*, 2011).

A análise da **Figura 28-2**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 2 o qual apresenta  $t_r = 10,2$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 120$  referente à quebra na porção p-aminobenzoil do ácido fólico (SCURACHIO *et al.*, 2011).

A análise da **Figura 28-3**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 3 o qual apresenta  $t_r = 18,7$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 285$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 284 Da referente a um fragmento da FMN, formil-lumiflavina (CARDOSO *et al.*, 2006). A existência do íon pseudo-molecular  $[M+H-H_2O]^+$  com  $m/z = 439$  refere-se a perda de água da FMN. O íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 457$  sugere a existência de um composto com massa molecular de 456 Da que se refere a FMN.

A análise da **Figura 28-4**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 4 o qual apresenta  $t_r = 20,5$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 377$ , que sugere a presença de um composto com massa molecular de 376 Da referente à riboflavina (CARDOSO *et al.*, 2006). O íon pseudo-molecular  $[M+Na]^+$  com  $m/z = 399$  refere-se ao aduto de sódio da riboflavina (CARDOSO *et al.*, 2006).

A análise da **Figura 28-5**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 5 o qual apresenta  $t_r = 22,8$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 456$   $m/z$ , que revela a presença de um composto com massa molecular de 455 Da referente a um composto derivado do ácido fólico acrescido de 14 Da. O íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 309$  trata-se de um fragmento gerado do íon pseudo-molecular 456  $m/z$  que é um composto produto da oxidação do ácido fólico a imina, sem que ocorra clivagem e posterior oxidação da imina a oxaziridina, que sofre isomerização e forma o derivado estável  $\alpha$ -aril nitrona (SCURACHIO *et al.*, 2011).

A análise da **Figura 28-6**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 6 o qual apresenta  $t_r = 23,9$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$   $m/z = 529$ , que sugere a presença de um composto de massa molecular de 528 Da, ou seja, um composto com massa molecular 87 Da maior que a molécula do ácido fólico. Os íons pseudo-moleculares com  $m/z = 382$  e 253 tratam-se de fragmentos gerados do íon pseudo-molecular 529  $m/z$ , porém os dados sobre estes

fragmentos obtidos não foram suficientes para propor uma estrutura para este composto (SCURACHIO *et al.*, 2011).

A análise da **Figura 28-7**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 7 o qual apresenta  $t_r = 24,3$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 243$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 242 Da que se refere a um fragmento da FMN, lumicromo (CARDOSO *et al.*, 2006).

A análise da **Figura 28-8**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 8 o qual apresenta  $t_r = 27,7$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 395$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 394 Da.

A análise da **Figura 28-9**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 9 o qual apresenta  $t_r = 28,6$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 423$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 422 Da.

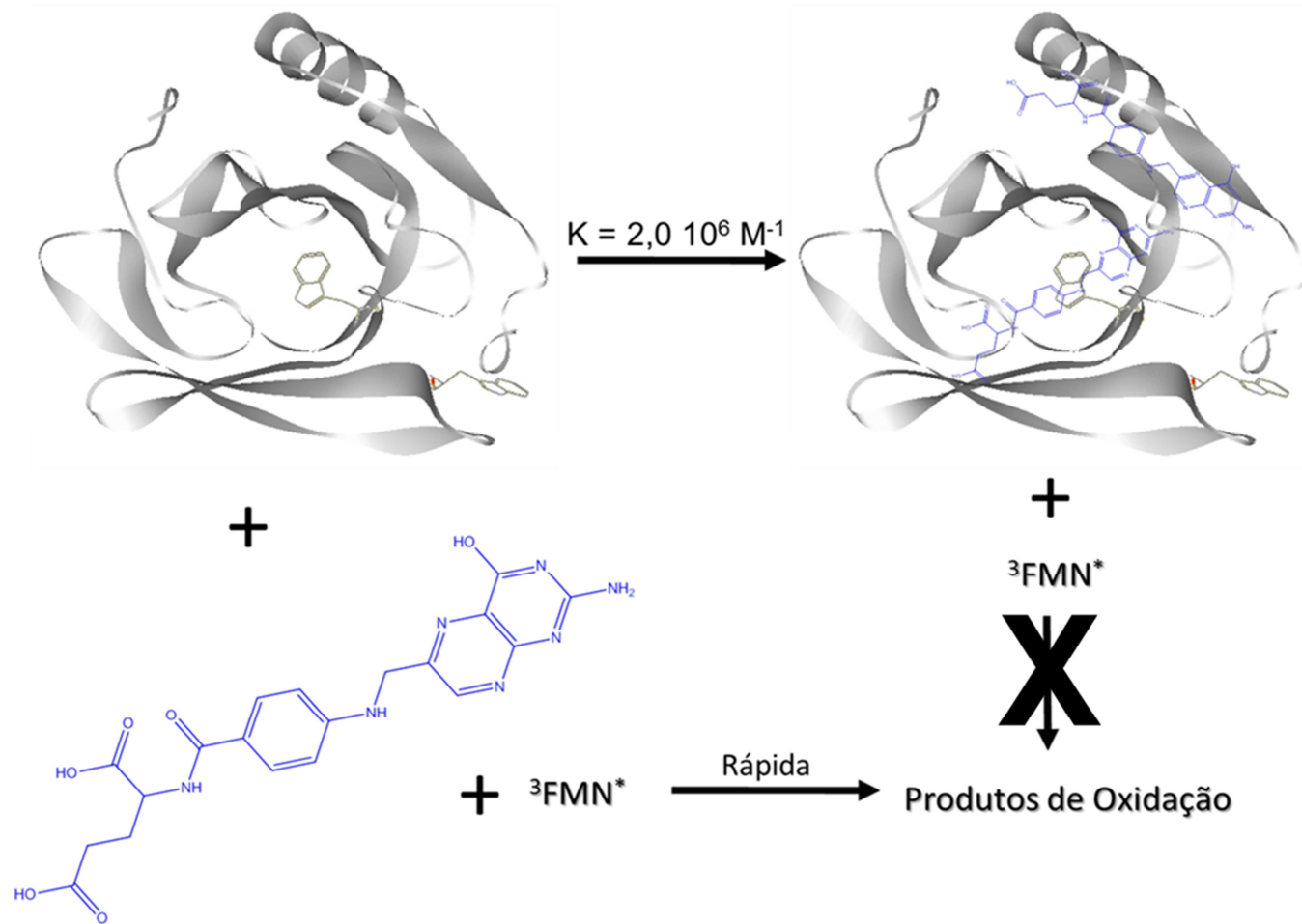
A análise da **Figura 17-10**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 10 o qual apresenta  $t_r = 29,8$  minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular  $[M+H]^+$  com  $m/z = 229$  que sugere a presença de um composto com massa molecular de 228 Da.

A análise da **Figura 28-11**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 11 o qual apresenta  $t_r = 31,3$  minutos, revela a existência dos íons pseudo-moleculares com  $m/z = 149$  e 301 que sugerem a presença de compostos com massa molecular de 148 e 300 Da respectivamente.

Entretanto, devido à falta de informações após se analisar os dados dos fragmentos obtidos, não foi possível atribuir possíveis estruturas químicas para os compostos referente aos picos 8, 9 10 e 11 sendo necessário investigações adicionais por técnicas modernas tais como LC-SPE-RMN.

Com os dados obtidos, foi possível sugerir uma proposta que ilustra aumento da fotoestabilidade do ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG sensibilizado pela  $^3\text{FMN}^*$ , o qual é ilustrado no **Esquema 2**.

Esquema 2 - Proposta para aumento da fotoestabilidade do ácido fólico complexado com  $\beta$ -LG sensibilizado pela  $^3\text{FMN}^*$ .



## 5. Conclusão

O conjunto de dados reunidos neste trabalho nos permitiu avaliar a reatividade das vitaminas do complexo B (ácido fólico, piridoxal, biotina e niacina) frente a fotooxidação sensibilizada por flavinas (vitamina B2). O valor da constante de velocidade específica de desativação do estado singleto excitado da FMN pelo PLP sugere a existência de um complexo [FMN...PLP] no estado fundamental e indicando que o processo de supressão do estado singleto excitado é um processo puramente estático. Não foi observada diferença significativa entre as constantes de desativação do estado tripleto excitado da FMN pelo PLP em meio aquoso e de óxido de deutério. A não observância deste efeito cinético isotópico em conjunto com os parâmetros termodinâmicos e a atribuição do espectro eletrônico de transientes corrobora com um processo de transferência direta de elétrons (ET) do PLP para a  $^3\text{FMN}^*$  e não um processo de transferência de átomo de hidrogênio (HAT). Ao comparar-se a constante de desativação da FMN tripleto excitada pelo PLP com a constante de velocidade de desativação do estado tripleto excitado da riboflavina por oxigênio molecular, verifica-se que ambos processos são cineticamente competitivos e a preferência cinética de um ao outro depende da matriz alimento em termos de teores de PLP, oxigênio dissolvido, e da presença de outros supressores.

O rendimento quântico de fotodegradação do PLP em meio aerado é 2,5 vezes superior ao encontrado para a reação em meio anaeróbico sugerindo uma significativa contribuição da reação entre o PLP e o íon superóxido gerado no processo de regeneração (redução) do radical neutro da FMN à FMN e participação competitiva da FMN pelo oxigênio singleto excitado.

A biotina e niacina não suprimiram os estados singleto e tripleto excitados das flavinas, fato este condizente com seus altos potenciais de oxidação,  $E^\circ > 2 \text{ V vs. NHE}$ .

A investigação da proteção do ácido fólico pela complexação a proteína  $\beta$ -LG frente a degradação induzida por luz e sensibilizada por flavinas demonstra uma potencial aplicabilidade do uso do soro do leite como veículo e antioxidante em alimentos enriquecidos e fortificados com vitaminas do complexo B.

O presente trabalho deixa evidente a necessidade de atenção às condições de embalagem e estocagem para alimentos e bebidas ricos em vitamina B2 quando

suplementados com PLP e ácido fólico e que apenas a remoção de oxigênio não inibe o processo de fotodegradação sugerindo que a adequada seleção de antioxidantes naturais (compostos fenólicos, metil-xantinas e proteínas do soro do leite) é a melhor abordagem no desenvolvimento de produtos nutritivamente ricos e seguros.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, M. V.; DELLA LUCIA, C. M.; SARTORI, M. A.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Perdas de vitaminas em leite e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 207-217, 2008.

ALLEN, L.; de BENOIST, B.; DARY, O.; HURRELL, R. **Guidelines on food fortification with micronutrients**. Geneva: World Health Organization and Food and Agriculture Organization, 2006. p. 341.

ALWERT, J. G.; PITTS, J. N. **Photochemistry**. New York: Wiley, 1967. p. 779-789.

BAILEY, L. B.; GREGORY, J.F. Folate metabolism and requirements. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 779-782, 1999.

BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 597-607, 2002.

BECKER, E. M.; CARDOSO, D. R.; SKIBSTED, L. H. Deactivation of riboflavin triplet-excited state by phenolic antioxidants: mechanism behind protective effects in photooxidation of milk-based beverages. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 382–386, 2005.

BENDER, D. A. **Introduction to nutrition and metabolism**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 384.

BILSKI, P.; LI, M. Y.; EHRENSHAFT, M.; DAUB, M. E.; CHIGNELL, C. F. Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxine) and Its Derivatives Are Efficient Singlet Oxygen Quenchers and Potential Fungal Antioxidants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 2, p. 129-134, 2000.

BOWD, A.; BYROM, P.; HUDSON, J. B.; TURNBULL, J. H. Excited states of flavine coenzymes – III. Fluorescence and phosphorescence emissions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 1968.

BRINKEVICH, S. D.; SVERDLOV, R. L.; LAGUTIN, P. Y.; SHADYRO, O. I. Effects of B vitamins on the radiation-induced transformations of hydroxyl-containing organic compounds, **Radiation Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 414-419, 2011.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 12<sup>th</sup> ed. Rahway: Merck, 1996. p. 1120.

CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Reactivity of bovine whey proteins, peptides and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6602–6606, 2004.

CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Phenol and terpene quenching of singlet- and triplet-excited states of riboflavin in relation to light-struck flavor formation in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5630–5636, 2006.

CARDOSO, D. R.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by scorbate, carotenoids and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6285–6291, 2007.

CARDOSO, D. R.; LIBARDI, S. H.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food & Function**, v. 3, p. 487-502, 2012.

CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processamento de leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 3, p. 389-395, 2003.

CHANDLER, C. J.; HARRISON, D. A.; BUFFINGTON, C. A.; SANTIAGO, N. A.; HALSTED, C. H. Functional specificity of jejunal brush-border pteroylpolyglutamate hydrolase in pig. **American Journal Physiology**, v. 260, p. 865-872, 1991.

COBURN, S. P. A critical review of minimal B6 requirements for growth in various species with a proposed method of calculation. **Vitamins & Hormones**, v. 48, p. 259-300, 1994.

COMBS, G. F. **The Vitamins, fundamental aspects in nutrition and health.** New York: Academic, 1998. p. 616.

DAKSHINAMURTI, K. Biotin – A Regulator of Gene Expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 419-423, 2005.

DE LEENHEER, A. P.; LAMHERT, W. E.; VAN BOCXLAER, J. F. **Modern chromatography analysis of vitamins.** 3<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 459.

DEROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351-371, 2002.

EBBELING, C. B.; PAWLAK, D. B.; LUDWIG, D. S. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. **The Lancet**, v. 360, p. 473-482, 2002.

EDWARDS, A. M.; SILVA, E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 63, p. 126-131, 2001.

FOX, P.F; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Academic, 1998. p. 496.

FUH, R. A. **Molar extinction of riboflavin.** Disponível em: <[http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/abs\\_html/riboflavin.html](http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/abs_html/riboflavin.html)>. Acesso em: 06 set. 2011.

GU, Q.; KENNY, J. E. improvement of inner filter effect correction based on determination of effective geometric parameters using a conventional fluorimeter. **Analytical Chemistry**, v. 81, n 1, p. 420-426, 2009.

HAUG, I. J.; SKAR, H. M.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; DRAGET, K. I. Electrostatic effects on  $\beta$ -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2287-2293, 2009.

HORWITT, M. K.; HARPER, A. E.; HENDERSON, L. M. Niacin-tryptophan relationships for evaluating niacin equivalents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, p. 423-427, 1981.

HUANG, R. **Kinetics and effects of riboflavin photosensitized degradation on soymilk flavor stability**. 2006. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos e Tecnologia) - The Ohio State University, Columbus, 2006.

HUVAERE, K.; CARDOSO, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; WESTERMANN, S.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 5583-5593, 2010.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review:  $\beta$ -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 785-796, 2004.

LEUSSING, D.L. Model reactions. In: DOLPHIN, D.; POULSON, R.; AVRAMOVIC, O. **Coenzymes and cofactors**. New York: John Wiley, 1986. p. 69-115.

LI, G.; GLUSAC, K. D. Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 4573-4583, 2008.

LI, H.; MELØ, T. B.; NAQVI, K. R. Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 34-39, 2012.

LIANG, L.; SUBIRADE, M.  $\beta$ -Lactoglobulin/folic acid complexes: formation, characterization and biological implication. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 6707-6712, 2010.

LIBARDI, Silvia H. **Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos- estudo da vida de prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 82-87, 2004.

LU, C.; BUCHER, G.; SANDER, W. Photoinduced interactions between oxidized and reduced lipoic acid and riboflavin (vitamin B2). **European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 2004

LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, p. 121–138, 2000.

MARTIN, C.B.; WALKER, D.; SONIAT, M. Density functional theory study of possible mechanisms of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 208, n. 1, p. 1-6, 2009.

MCCORMICK, D.B. Riboflavin. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994. p. 366-375.

MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 529-536, 2004.

MOREIRA, E. M. R. **Determinação da riboflavina por voltametria com adsorção**. 1999. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 1999.

MUROV, S. L.; CARMICHAEL, I.; HUG, G. L. **Handbook of photochemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 424.

NAKAGAWA, I.; TAKAHASHI, T.; SASAKI, A.; KAJIMOTO, M.; SUZUKI, T. Efficiency of conversion of tryptophan to niacin in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1195-1199, 1973.

NASSER, C.; NOBRE, C.; MESQUITA, S.; RUIZ, J. G.; CARLOOS, H. R.; PROUVOT, L.; YACUBIAN, E. M. T. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 11, n. 4, p. 199-203, 2005.

OFF, M. K.; STEINDAL, A. E.; POROJNICU, A. C.; JUZENIENE, A.; VOROBAY, A.; JOHNSON, A.; MOAN, J. Ultraviolet photodegradation of folic acid. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 80, n. 1, p. 47-55, 2005.

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Editora Manole, 2003. 612 p.

ROCHA, R. C.; TOMA, H. E. Transferência de elétrons em sistemas inorgânicos de valência mista. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 624-638, 2002.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n.3, p. 563-568, 2006.

SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 17-24, 2007.

SAUBERLICH, H. E. Interaction of vitamin B6 with other nutrients. In: REYNOLDS, R. D.; LEKLEM, J. E. **Vitamin B6**: its role in health and disease. New York: Alan R. Liss, 1985. p. 193-217.

SCHMIDT, R. Influence of heavy atoms on the deactivation of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) in solution. **Journal of the American Chemical Society**, v.111, p. 6983-6987, 1989.

SCURACHIO, R. S.; SKIBSTED, L. H.; METZKER, G.; CARDOSO, D. R. Photodegradation of folate sensitized by riboflavin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 840-845, 2011.

SEYMONS, K.; DE MOOR, A.; DE RAEVE, H.; LAMBERT, J. Dermatologic signs of biotin deficiency leading to the diagnosis of multiple carboxylase deficiency. **Pediatric Dermatology**, v. 3, p. 231-235, 2004.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Modern nutrition in health and disease**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1951p.

SIMONI, D. A.; de ANDRADE, J. C.; FAIGLE, J. F. G.; SIMONI, J. A. Um experimento com propostas múltiplas para um laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1034-1039, 2002.

SKIBSTED, L.H. Light-induced changes in dairy products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 346, p. 4-9, 2000.

SONG, Q.; HWANG, K. C. Direct observation for photophysical and photochemical processes of folic acid in DMSO solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 185, n. 1, p. 51-56, 2007.

de SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887-891, 2005.

STREIT, W. R., ENTCHEVA, P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 21-31, 2003.

SUITOR, C.W. AND BAILEY, L.B., Dietary folate equivalents: interpretation and application, **Journal of the American Dietetic Association**, v.100, n. 1, p. 88–94, 2000.

WELCH, R. A. S.; BURNS, D. J. W.; DAVIS, S. R.; POPAY, A. L.; PROSSER, C. G. **Milk Composition, Production and Biotechnology**. Michigan: CAB International, 1997. p. 512. (Biotechnology in Agriculture Series, 18)

WIZNITZER, M.; BANGERT, B. A. Biotinidase deficiency: clinical and MRI findings consistent with myelopathy. **Pediatric Neurology**, v. 29, p. 56-58, 2003.

WOLF, B.; GRIER, R. E.; ALLEN, R.; GOODMAN, S. I.; KIEN, C. L. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, v.131, p. 273-281, 1983.

YOUNG, V. R.; NEWBERNE, P. M. Vitamins and cancer prevention: issues and dilemmas. **Cancer**, v.47, n. 5, p. 1226-1240, 1981.

ZEMPLINI, J.; RUCKER, R. B.; MCCORMICK, D. B.; SUTTIE, J. W. **Handbook of Vitamins**, 4<sup>th</sup> ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007. 593 p.