UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

***Fotodegradação de folatos sensibilizados
por flavinas***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Química Analítica.

Nome: Regina Spricigo Scurachio

Orientador: Prof. Dr. Daniel R. Cardoso

São Carlos, 15 de outubro de 2010

Aos meus pais, Roberto e Maria de Lourdes,
e as minhas irmãs, Edynea e Talita, pelo
apoio constante e por acreditarem em mim.
Agradeço por ter vocês sempre ao meu lado!

“A única fonte de conhecimento é a experiência”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus pela dádiva da vida e força para vencer os obstáculos e alcançar os meus objetivos.

Aos meus tios José Antônio e Rosemary, a minha prima Jenifer e a minha avó Edynea por me acolherem durante estes anos em que estive estudando.

Ao prof. Dr. Daniel R. Cardoso, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório da Química da Aguardente e da Inorgânica do IQSC-USP, André (Barbie), Thiago (Papa), Thiago, Ana, Leandro (Boi), Fernanda, Daniela, Wendel, Silvia, Felipe, Carlos, Itapira, Ivonete, Silmara, Natália, e aos grandes amigos da turma de graduação do IQSC-USP de 2003.

As minhas “co”: Juliana, Juliana, Viviana, Jenifer, Letícia, por me ajudarem sempre e por serem amigas de verdade, em quem posso sempre confiar !!

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

A CAPEs pela bolsa de estudos concedida.

Resumo

O ácido fólico, a forma mais estável entre os folatos, é indicado como forma de prevenção sendo encontrado em forma de suplementação medicamentosa e alimentos fortificados, como leite e derivados. O folato pode reagir com a riboflavina singlete excitada, $^1k_q = 4,8 \cdot 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, como determinado por desativação da fluorescência do estado estacionário, e com a riboflavina triplete excitada, com uma reação um pouco mais lenta, $^3k_q = 4,8 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, como determinado por fotólise de pulso de laser e espectroscopia de absorção de transientes verificando-se que ambos os processos são competitivos e próximos ao limite de difusão. A preferência cinética de um a outro depende da matriz alimentar. O rendimento quântico para solução de riboflavina e de folato preparado em solvente aquoso e deuterado e em meio anaeróbico e aeróbico mostrou a prevalência do mecanismo fotoreacional do Tipo I. A voltametria cíclica apresentou um processo irreversível anódico de dois elétrons para o ácido fólico ($E = 1,14 \text{ V vs. NHE}$). Os principais produtos da fotodegradação do folato sensibilizado pela riboflavina foram identificados por LC-IT-MS/MS como: 6-carboxipterina, p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico e oxaziridina derivada do ácido fólico, como confirmando a desativação química do estado triplete excitado da riboflavina por transferência de elétrons com subsequente clivagem oxidativa entre N(10) e C(9) no ácido fólico.

Abstract

Folic acid, the most stable among folate, is recommended as prevention and it is found in supplementation and fortified foods such as milk and dairy products. The folate can react with singlet-excited state of riboflavin, $^1k_q = 4.8 \cdot 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, as determined by steady-state fluorescence quenching, and with triplet-excited state of riboflavin in a slower reaction with $^3k_q = 4.8 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, as determined by laser flash photolysis and transient absorption spectroscopy, verifying that both the processes are competitive and they are near limited diffusion. The kinetic preference depends on the matrix food. The quantum yield for the solution of riboflavin and folate prepared in aqueous and deuterated solvents and in anaerobic and aerobic medium showed the prevalence of the mechanism Type I. The cyclic voltammetry showed an irreversible two-electron anodic process for folate ($E = 1.14 \text{ V}$ vs. NHE). The main products of folate photodegradation sensitized by riboflavin were identified by LC-IT-MS/MS as: pterin-6-carboxylic acid, p-aminobenzoyl-L-glutamic acid and oxaziridine derivative of folic acid, as confirming chemical quenching of the triplet-excited state of riboflavin by electron transfer with subsequent oxidative cleavage between N(10) and C(9) in folic acid.

Lista de Figuras

Figura 1. (a) Estrutura química e (b) espectro eletrônico de absorção de uma solução aquosa $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fólico $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.	20
Figura 2. Mecanismo de transferência de elétron fotoinduzido proposto da fotodecomposição do ácido fólico (Martin et. al. 2009).	23
Figura 3. (a) estrutura química e (b) espectro eletrônico de absorção de uma solução aquosa $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.	25
Figura 4. Espectro de emissão da luz solar e de uma lâmpada fluorescente.	26
Figura 5. Diagrama de Jablonski, onde S_0 = estado fundamental; S_1 = primeiro estado excitado singlete, T_n = estado excitado tripleto; T_1 = primeiro estado excitado tripleto.	27
Figura 6. Formação do estado tripleto excitado da riboflavina após exposição a radiação luminosa (440 nm). Modificado de (Cardoso et. al. 2005) e (Huvaere et. al. 2010).	28
Figura 7. Esquema do mecanismo de fotooxidação do Tipo I e Tipo II.	30
Figura 8. Espectro eletrônico da solução de ácido fólico $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e riboflavina $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica de $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).	39
Figura 9. Espectro de emissão de fluorescência de uma solução aquosa de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de diferentes concentrações de ácido fólico em tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$. Comprimento de onda excitação de 440nm com largura de fenda de 5 nm e a emissão monitorada em 530nm com largura de fenda de 10 nm.	40
Figura 10. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina singlete excitada em tampão fosfato $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ por ácido fólico.	41
Figura 11. Espectro eletrônico da ΔAbs do estado tripleto excitado da riboflavina (T-T) registrado 0,2s após o pulso de laser de 355 nm (8 ns) com energia $\cong 3 \text{ mJ.cm}^2$.	42

- Figura 12.** Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor (ácido Fólico). Solução aquosa de tampão fosfato $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ saturada com Ar e pH ajustado para 7 (força iônica = 0,2) contendo $70 \mu\text{M}$ de riboflavina (pulso de laser de 355 nm com energia de 6 mJ.cm^2). 43
- Figura 13.** Gráfico de k_{obs} versus [ácido fólico]. 44
- Figura 14.** Voltamogramas Cíclicos do ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I= 0,2$ utilizando os seguintes eletrodos: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). As velocidades de varredura utilizadas foram: a=10, b=20, c=50, d=100, e=200 e f=500 mV s^{-1} . 45
- Figura 15.** Corrente de pico anódica versus raiz quadrada da velocidade de varredura da solução de ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$. 46
- Figura 16.** Voltamogramas de pulso diferencial do ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I= 0,2$. Varredura: 0,0 a 1,1V vs ECS. Potencial de *stand-by* 0,0 V. Os eletrodos utilizados foram calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). Velocidades de varredura utilizadas: a=10 mV s^{-1} e amplitude modular de 25mV, b=10 mV s^{-1} e amplitude modular de 100mV e c=30 mV s^{-1} e amplitude modular de 100mV. 47
- Figura 17.** Voltamogramas cíclicos da mistura de (b) ácido fólico $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de (a) hexacianoferrato $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ feito em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I= 0,2$ e a velocidade de varredura utilizada foi de 100 mVs^{-1} . Os eletrodos utilizados foram calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). 48
- Figura 18.** Figura indicando a comparação das áreas das soluções de ácido fólico $5,0.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de hexacianoferrato $5,0.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ feitas em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I= 0,2$ e a velocidade de varredura utilizada foi de 100 mVs^{-1} . 49
- Figura 19.** Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de ácido fólico e riboflavina: A) operando no modo de detecção negativo e B) operando no modo de detecção positivo. 54

Figura 20: 1)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 2)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 3)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 4)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 5)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 6)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B). 7)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 7 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, no modo de detecção positivo (A). 8)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 8 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, no modo de detecção positivo (A).	56
Figura 21. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS do íon 208 m/z referente ao pico 1 da Figura 19 com t_r = 3,1 minutos.	59
Figura 22. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 208→192→varredura do íon fragmento referente ao pico 1 da Figura 19 .	60
Figura 23. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 208→192→varredura do íon fragmento referente ao pico 1 da Figura 19 .	60
Figura 24. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 208 m/z originando os íons fragmento 164 e 192 m/z.	61
Figura 25. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS do íon pseudo-molecular 267 m/z referente ao pico 2 da Figura 19 com t_r = 3,8 minutos.	61
Figura 26. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 266 m/z gerando o íon fragmento 120 m/z.	62
Figura 27. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS do íon pseudo-molecular	63

295 m/z e t_r = 5,7 minutos referente ao pico 3 da Figura 19 .	
Figura 28. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 313 m/z e t_r = 5,8 minutos referente ao pico 3 da Figura 19 .	63
Figura 29. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 148 m/z e t_r = 5,8 minutos referente ao pico 3 da Figura 19 .	64
Figura 30. Esquema da fragmentação do ácido fólico gerando os íons 313, 148 e 295 m/z.	64
Figura 31. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 377 m/z referente ao pico 4 da Figura 19 e t_r = 6,7 minutos.	65
Figura 32. Esquema da fragmentação da riboflavina levando a formação do íon fragmento $[M+H-ribitol]^+ = 243$ m/z.	66
Figura 33. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 456 m/z referente ao pico 5 da Figura 19 e t_r = 7,1 minutos.	66
Figura 34. Espectro de massas ESI(+)MS/MS/MS da transição 456→327→varredura do íon fragmento referente ao pico 5 da Figura 19 e t_r = 7,2 minutos.	67
Figura 35. Espectro de massas ESI(+)MS/MS/MS da transição 456→309→varredura do íon fragmento referente ao pico 5 da Figura 19 e t_r = 7,1 minutos.	67
Figura 36. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 456 m/z levando a formação do íon fragmento 309 m/z.	68
Figura 37. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo molecular 529 m/z referente ao pico 6 da Figura 19 e t_r = 8,7 minutos.	68
Figura 38. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 359 m/z referente ao pico 7 da Figura 19 e t_r = 12,1 minutos.	69
Figura 39. Espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular 301 m/z referente ao pico 8 da Figura 19 e t_r = 19,1 minutos.	70
Figura 40. Espectro de massas ESI(+)MS/MS/MS da transição 301→245→varredura do íon fragmento referente ao pico 8 da Figura 19 e t_r = 18,9 minutos.	70

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teor de ácido fólico em alimentos.	19
Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados.	32
Tabela 3. Gradiente de eluição utilizado na quantificação do ácido fólico fotodegradado.	34
Tabela 4. Gradiente de eluição utilizado na separação analítica dos fotoprodutos de degradação em uma coluna Agilent C-18. A detecção foi realizada por ESI-MS.	35
Tabela 5. Concentrações analíticas utilizadas nos experimentos de supressão de emissão molecular das soluções de riboflavina e ácido fólico em meio aquoso tampão fosfato $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I=0,2$.	36
Tabela 6. Valores médios da intensidade da luz incidente obtida.	52
Tabela 7. Rendimento quântico obtido pela fotólise da solução de ácido fólico e riboflavina.	53

Lista de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo reacional proposto para a fotooxidação do ácido fólico sensibilizado pela riboflavina.	73
Esquema 2. Ilustração da formação do radical do AF.	71
Esquema 3. Ilustração da formação da imina derivada do AF.	71
Esquema 4. Ilustração da formação dos produtos da hidrólise da imina derivada do AF.	72
Esquema 5. Ilustração da formação da oxidação da imina derivada do AF.	72

Lista de Abreviaturas

RDA= Ingestão Diária Recomendada

Glu= Ácido Glutâmico

PABA= Ácido p-amino-benzóico

PT= Pterina

FMN = Flavina mononucleotídeo

FAD= Flavina adenosina dinucleotídeo

UHT= ultra high temperature

ISC= Cruzamento intersistema

DFT= Teoria da densidade funcional

SOMO= Orbital Molecular Ocupado Individualmente

Rib= riboflavina

AF= Ácido Fólico

ET= Transferência de elétrons

HAT= Transferência de átomo de hidrogênio

SPLET= Perda de próton seguida por transferência de elétrons

PCET= Transferência de elétrons acoplado a próton

$\text{Rib}^{\bullet-}$ = radical ânion semiquinona da riboflavina

$\text{RibH}^{\bullet}$ = radical semiquinona da riboflavina

$\text{HOO}^{\bullet}$ = radical hidroperoxila

$\text{ROO}^{\bullet}$ = radical peroxila

$^3\text{O}_2$ = oxigênio molecular

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singlete

Sub= substrato

UV= ultra-violeta

$^3\text{Rib}^*$ = riboflavina triplete excitada

$^1\text{Rib}^*$ = riboflavina singlete excitada

NHE= eletrodo normal de hidrogênio

ECS= eletrodo de calomelano saturado

TIC = Cromatograma total dos íons

LC-ESI-MS/MS= cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas de múltiplo estágio.

ESI= ionização por electrospray

t_r = tempo de retenção

m/z = relação massa/carga

WHO= World Health Organization

FAO= Food and Agricultural Organization of the United Nations

FAD= flavina adenosina dinucleotídeo

FMN= flavina mononucleotídeo

VDP=voltametria de pulso diferencial

CID=Collision induced dissociation

Da= daltons

Índice

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Esquemas	
Abreviações	
Índice	
1-Introdução	15
1.1- Ácido fólico (Ácido <i>N</i> -(4-[(2-amino-1,4-diidro-4-oxo-6-pteridinil) metil]amino} benzoil)-L-glutâmico).	17
1.2- Riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina).	24
1.3-Fotopropriedades da riboflavina.	27
2-Objetivos	31
3-Materiais e Métodos	32
3.1. Reagentes utilizados.	32
3.2. Preparação do sal de Parker $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$.	32
3.3. Fotólise.	33
3.4. Determinação do rendimento quântico.	34
3.5. Determinação dos principais fotoprodutos.	35
3.6. Desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo ácido fólico.	36
3.7. Desativação do estado triplete excitado da riboflavina pelo ácido fólico.	37
3.8. Determinação do potencial de oxidação do ácido fólico.	37
4- Resultados e Discussão	39
5- Conclusão	74
6- Referências Bibliográficas	75

1. Introdução

Vitaminas são micronutrientes, constituintes minoritários dos alimentos, essenciais para o desenvolvimento normal, manutenção da saúde e funções metabólicas do organismo humano (1, 2, 3). Atualmente, entre as principais carências nutricionais da dieta, a deficiência de vitaminas assume graves proporções no contexto da saúde pública em todo o mundo (1). Diversos estudos epidemiológicos indicam uma ingestão insuficiente de vários micronutrientes por parte da população mundial (1,3). Como forma de intervenção no quadro de deficiência de micronutrientes e com o objetivo de atender às recomendações nutricionais para a manutenção da saúde populacional, as políticas governamentais têm se preocupado não somente com a definição de padrões de identidade e segurança alimentar, mas também com políticas de estímulo a fortificação¹ de produtos alimentícios com micronutrientes (1).

A atual demanda por parte dos consumidores de alimentos de alta qualidade e ricos nutricionalmente, por exemplo, os alimentos fortificados, têm forçado o enriquecimento dos alimentos com micronutrientes por parte da indústria como uma “estratégia de marketing”. Desta forma, as vitaminas B1, B2, B6, B12, PP, biotina e mais recentemente o ácido fólico, tem despertado interesse da indústria na produção de alimentos enriquecidos (1,2,3).

¹Fortificação é a prática deliberada de aumentar o conteúdo de um micronutriente essencial (vitaminas e minerais) em um alimento, de modo a melhorar a qualidade nutricional destes e fornecer um benefícios a 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 (4).

Em função de sua crescente importância em processos metabólicos, a baixa biodisponibilidade, baixa concentração em suas fontes naturais e - mais importante - a baixa estabilidade química dos folatos têm sido a força motora no desenvolvimento de alimentos nutricionalmente enriquecidos com este micronutriente (4).

A partir de junho de 2004, as farinhas de milho e de trigo, bem como os produtos que utilizem essas matérias-primas em sua fabricação ou consumidos no Brasil, devem estar fortificados com ácido fólico (5). É patente, em países onde a fortificação de alimentos com ácido fólico já é praticada, uma diminuição significativa na incidência de defeitos de fechamento do tubo neural em recém nascidos (6,7).

Produtos lácteos, farinhas, cereais, biscoitos, entre outros produtos com expressivo consumo pela população, em geral, são aqueles utilizados para o enriquecimento com micronutrientes. O enriquecimento de produtos lácteos com vitaminas A e D é uma prática comum na indústria para se compensar perdas durante o processamento e estocagem ou simplesmente para aumentar seu valor nutritivo (1,2,3).

No Brasil, o processo de enriquecimento de alimentos com ácido fólico vem incluindo uma grande variedade de produtos, em especial, os lácteos (1,2,3). Entretanto, pouco se conhece sobre a estabilidade térmica e fotoquímica do ácido fólico na matriz láctea. O conhecimento sobre o comportamento do ácido fólico frente aos diversos processos e da sua estabilidade na matriz durante o armazenamento é vital para orientar o produtor quanto ao nível de fortificação, além das melhores condições de embalagem, transporte e armazenamento, a fim de se assegurar ao consumidor um alimento seguro e nutritivo.

Sendo assim, o objetivo principal do presente trabalho foi o de avaliar a estabilidade, reatividade e mecanismo de reação do ácido fólico frente a exposição da radiação luminosa na presença de flavinas (vitamina B2).

1.1. Ácido fólico (Ácido *N*-(4-[(2-amino-1,4-diidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino} benzoil)-L-glutâmico)

O ácido fólico, folacina ou ácido pteroil-L-glutâmico, também conhecido como vitamina B9, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B (6, 7, 8, 9). Folato é um termo genérico para uma grande família que apresenta atividade similar ao ácido pteroilglutâmico. O termo ácido fólico é usado para a forma sintética do folato, encontrada em suplementos vitamínicos e alimentos fortificados (1, 2, 3). O organismo humano não é capaz de sintetizar folato tendo que obter esta vitamina de fontes exógenas e via absorção intestinal (10).

O ácido fólico (do latim *folium*) é a forma mais estável e de maior biodisponibilidade entre os folatos, sendo esta selecionada para o enriquecimento de alimentos em função de seus efeitos de prevenção de doenças causadas por baixa ingestão da vitamina B9 (1, 2, 3, 6,7).

Os folatos naturalmente encontrados nos alimentos estão predominantemente sobre a forma de poliglutamato, com um número variável de resíduos glutamato. O intestino está exposto a duas fontes de folato: de origem exógena proveniente da dieta, na qual a vitamina é absorvida no intestino delgado e os folatos de origem endógena, no qual a vitamina é biosintetizada e absorvida pela ação de bactérias da microbiota normal no

intestino grosso. (10). O folato usualmente na forma de poliglutamato nos alimentos, primeiramente tem que ser hidrolisado a monoglutamato pelas enzimas folil conjugase do pâncreas e conjugase da mucosa da parede intestinal antes de ser absorvido e transportado para a corrente sanguínea. Apenas os monoglutamatos, como a forma sintética ácido fólico, são absorvidos no intestino delgado (11,12,13).

Os seguintes fatores podem retardar a absorção do folato alimentar e afetar negativamente o benefício do folato dos alimentos: deficiência do mineral zinco, visto que as metaloenzimas são dependentes deste; a ingestão excessiva de alimentos inibidores da enzima folilconjugase como laranjas e couves e ingestão crônica de álcool (11,12).

Devido a suas diferenças, folato e ácido fólico têm diferentes taxas de absorção. A taxa média de absorção pela população é a seguinte (9,11):

- Alimentos fortificados - 85%
- Ácido fólico (suplementos) - 100%
- Folatos - 50 a 60%

A biodisponibilidade de folatos em vários alimentos é dependente de um número de fatores tais como: desconjugação dos folatos poliglutamil no intestino; a matriz do alimento; a instabilidade de certos folatos lábeis durante a digestão (ou antes da digestão) e a presença de certos constituintes da alimentação que podem melhorar a estabilidade do folato durante a digestão (como por exemplo, proteínas ligadas a folato) (12).

A labilidade química de todos os folatos naturais resulta em uma significativa perda de atividade bioquímica durante as etapas de colheita, processamento, estocagem e preparação. Em vias gerais, metade ou até três-quartos da atividade biológica inicial do folato é perdida durante as etapas

supra-citadas. Isto ocorre em contraste com a estabilidade da forma sintética desta vitamina, o ácido fólico. Na forma sintética, o anel pterina (2-amino-4-hidroxipteridina) não se encontra reduzido, promovendo assim uma melhor resistência a oxidação química. Portanto, recomenda-se a ingestão de suplementos de ácido fólico, os quais são mais estáveis e apresentam 100% de biodisponibilidade. (12,13).

As principais fontes alimentares de folatos (vitamina B9) incluem uma ampla variedade de frutas e verduras, particularmente vegetais de folhas verdes como espinafre, couve e brócolis. Outras fontes são feijão branco, aspargos, laranja, fígado, peixes, gérmen de trigo, tomate, amendoim (6, 7, 8). A **Tabela 1** apresenta os teores médios de folatos em diversos alimentos e a respectiva % da ingestão dietética recomendada (RDA) por porção ingerida.

Tabela 2. Teor de ácido fólico em alimentos (14,15).

Fonte (porção média cotidiana)	Quantidade por porção (µg)	RDA (%)
Fígado	185	45
Espinafre	100	25
Aspargos	85	20
Feijão	50	15
Brócolis	45	10
Amendoim	40	10
Alface	40	10
Gérmen de trigo	40	10
Tomate	35	10
Laranja	30	8
Mamão	25	6
Banana	20	6
Cerveja	29 a 86	7 a 21

O ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_5$) apresenta-se como cristais amarelos, tendo peso molecular de $441,4 \text{ g mol}^{-1}$. É um composto bioconjugado formado por três partes: sistema de anel pterina, uma molécula de ácido p-aminobenzóico e ácido glutâmico (17). Sua estrutura química e espectro eletrônico de absorção estão representados **Figura 1**.

Figura 1(a). Estrutura química do ácido fólico.

Figura 1(b). Espectro eletrônico de absorção do ácido fólico.

Figura 1. (a) Estrutura química e (b) espectro eletrônico de absorção de uma solução aquosa $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fólico $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

O ácido fólico atua como coenzima em várias reações celulares fundamentais e é necessário na divisão celular devido ao seu papel na biosíntese de bases purinas e pirimidinas, na síntese do ácido nucléico DNA e RNA, além de atuar no metabolismo do aminoácido glicina. Consequentemente, sua deficiência pode ocasionar alterações na síntese de DNA e cromossômicas (6, 7, 8, 9).

Defeitos do tubo neural em recém nascidos são associados à deficiência de ácido fólico. Estes defeitos são descritos como más formações que ocorrem na fase inicial do desenvolvimento fetal, entre a terceira e a quinta semana de gestação, envolvendo a estrutura primitiva que dará origem ao cérebro e à medula espinhal (6, 7, 8). Anencefalia e espinha bífida respondem por cerca de 90% de todos os casos de defeitos do tubo neural além de lábio leporino e fenda palatina e malformações cardíacas (6, 7, 8). Mulheres que ingerem suplementos de ácido fólico depois do resultado do teste de gravidez correm o risco desta anomalia já estar em desenvolvimento, pois a época de aparecimento deste tipo de malformação é muito precoce (6, 7, 8). Desta forma a dose recomendada é de 50 µg por dia para adultos, 400 µg para mulheres e de 600µg por dia para gestantes (6, 7, 9). Considera-se difícil alcançar os valores diários recomendados para ingestão de folato com uma dieta normal e equilibrada (sem alimentos fortificados), pois esta fornece em média cerca de 25 µg/dia considerando o valor energético total de 2.200Kcal diárias (9). O ácido fólico também é essencial ao metabolismo da homocisteína, mantendo seus níveis fisiológicos normais. A elevação dos níveis de homocisteína pela deficiência de folato está associada a risco cardiovascular (6, 7, 8, 9, 16).

A interação do ácido fólico com a vitamina B12 (cobalamina) é indispensável para a produção dos glóbulos sangüíneos. A falta de ácido fólico

causa uma anemia macrocítica idêntica à observada pela deficiência da vitamina B12. Alguns estudos relatam que o aumento da ingestão de ácido fólico pode mascarar a deficiência de vitamina B12 em idosos (6, 7, 8, 16).

O ácido fólico absorve luz na região do ultravioleta com máximo de absorção em 280 e 350nm referentes a transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ (Figura 1). O coeficiente de absorção molar é $\epsilon_{280\text{nm}} = 25220 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{350\text{nm}} = 6765 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (17). Apresenta um baixo valor de rendimento quântico de fluorescência (menor que 0,005) devido à extremidade glutamyl do ácido fólico atuar como um desativante interno favorecendo a desativação não radioativa do estado singlete excitado (17,18).

O ácido fólico é um composto fotossensitivo. Após ser irradiado, o anel pterina absorve um fóton formando o estado singlete excitado. É previsto que ácido fólico sofra uma reação de transferência de elétrons fotoinduzida seguido por uma transferência de elétrons reversa na sua reação de fotodegradação. Nesta etapa propõe-se uma quebra da ligação heterolítica em que a transferência de elétron reversa procede através do sistema de ligação pi e sigma ao contrário da reação de transferência de elétrons espacial onde o elétron ignora o sistema de ligação e sua transferência da reação reversa ao cátion radical PABA. Considerando as estruturas dos íons radicais, um mecanismo da fotólise da ligação pterina-PABA é sugerido, **Figura 2** (19). Um elétron é então transferido inteiramente do anel pterina para o anel PABA resultando em um par de íons radical de cargas separadas. Em seguida, ocorre uma transferência reversa do elétron, resultando no estado fundamental singlete, ou através da ligação sigma resultando na fragmentação da ligação C(9)-N(10) (19).

Figura 2. Mecanismo de transferência de elétron fotoinduzido proposto da fotodecomposição do ácido fólico (Martin et. al. 2009).

Os principais produtos de fotodegradação do ácido fólico em solução aquosa foram identificados como p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico e 6-carboxipterina (19, 20, 21,22).

1.2. Riboflavina (7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina)

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, também conhecida como vitamina B2, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B e está presente em diversos alimentos (23, 24, 25, 26). Os produtos lácteos são considerados a maior fonte de vitamina B2, juntamente com ovos e fígado (23, 24, 25, 26). O leite in natura contém aproximadamente 1,75 mg de riboflavina por 1L (27). Majoritariamente, entre 65-95%, da riboflavina no leite está presente na forma livre e a fração restante como FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenosina dinucleotídeo) (28).

A riboflavina é necessária na síntese do FAD e do FMN, dois cofatores enzimáticos essenciais no funcionamento de enzimas oxiredutases 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 (28). Além disso, a vitamina B2 favorece o metabolismo das gorduras, açúcares e proteínas e é importante para a saúde dos olhos, pele, boca e cabelos (23, 24, 25, 26). Também é necessária para a formação de células vermelhas do sangue, respiração, produção de anticorpos, regulação do crescimento e da reprodução humana (26).

A deficiência de riboflavina provoca 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 (23, 24, 25). A riboflavina pode também interferir no metabolismo de outros nutrientes, principalmente no metabolismo de outras vitaminas do complexo B, tais como folatos, cobalamina (vitamina B12) e piridoxina (vitamina B6) (29).

A riboflavina ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) possui peso molecular de $376,36 \text{ g mol}^{-1}$ e coloração amarelada. Sua estrutura química e espectro eletrônico de absorção estão ilustrados na **Figura 3**.

Figura 3 (a). Estrutura química da (a) riboflavina, (b) FMN, (c) FAD.

Figura 3(b): Espectro eletrônico da riboflavina.

Figura 3. (a) estrutura química e (b) espectro eletrônico de absorção de uma solução aquosa $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A riboflavina é uma vitamina estável termicamente e o seu teor em leite e derivados lácteos é praticamente inalterado pelo processo de pasteurização, tratamento UHT (*ultra high temperature*) e cozimento do

alimento. Entretanto, a riboflavina decompõe-se rapidamente em solução quando da exposição do produto a radiação luminosa (29). A fotodegradação da riboflavina segue um decaimento de primeira ordem em solução; como por exemplo, leite fluido (30,31).

A intensidade da radiação luminosa, o tempo de exposição e o comprimento de onda da luz incidente são fatores determinantes da velocidade de degradação desta vitamina no produto. É importante observar que a luz solar é comprovadamente mais efetiva no processo de fotodecomposição quando comparada a luz emitida por lâmpadas fluorescentes, fator este atribuído a componente UV da radiação solar. A **Figura 4**, ilustra com fins de comparação o espectro de emissão da luz solar e de uma lâmpada fluorescente típica de iluminação de ambientes como cozinhas e supermercados.

Figura 4. Espectro de emissão da luz solar e de uma lâmpada fluorescente.

1.3. Fotopropriedades das flavinas.

Conforme observado na Figura 3, o cromóforo anel tricíclico de isooloxazina, comum a todas as flavinas, possui duas bandas características de absorção na região do visível com máximo de absorção em 375 e 446nm. Os correspondentes valores de absortividade molar ($\epsilon_{375\text{nm}} = 9.155 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{446\text{nm}} = 10.645 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (32), consideravelmente altos, são um indicativo de transições $\pi - \pi^*$ resultando em estados singlete excitados.

A fluorescência do estado transiente (ca. 5 ns) excitado S_1^2 ($\lambda = 530\text{nm}$) é competitiva com o cruzamento intersistemas (ISC) levando a molécula ao estado metaestável triplete excitado de menor energia e maior tempo de vida (ca.15 μs). O diagrama de Jablonski (**Figura 5**) ilustra o processo de formação do estado triplete excitado após a inicial absorção da radiação luminosa.

Figura 5. Diagrama de Jablonski, onde S_0 = estado fundamental; S_1 = primeiro estado excitado singlete, T_n = estado excitado triplete; T_1 = primeiro estado excitado triplete.

²Em função dos rendimentos quânticos de fluorescência serem independentes do comprimento de onda de excitação (260-500nm), a excitação ao mais alto estado singlete ($S_n > 1$) é seguida por uma rápida conversão interna ao primeiro estado singlete excitado (S_1). Assim, pode-se assumir que o cruzamento intersistemas (ISC) para o estado triplete excitado ($T_n \geq 1$) é apenas observado a partir do estado S_1 .

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 triplete excitado da riboflavina ($S=1$) pode ser descrito como um biradical (33), como ilustrado na **Figura 6**. 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 (33). Entretanto, estas alterações significantes ocasionam alterações significantes no espectro de absorção do estado triplete excitado (veja **Figura 11** na parte de resultados).

Figura 6. Formação do estado triplete excitado da riboflavina após exposição a radiação luminosa (440 nm). Modificado de (Cardoso et. al. 2005) e (Huvaere et. al. 2010).

O estado triplete excitado das flavinas decai através de transições radioativas, **Figura 5**, exibindo emissão de luz laranja-vermelho ($\lambda_{\text{max}} = 610$ nm), fosforescência, a baixas temperaturas (34). Contrariamente ao baixo valor de rendimento quântico observado para o processo de fosforescência, dados da fotólise por pulso de laser em nano segundos (espectroscopia de

transientes) revelam um eficiente cruzamento intersistemas ($S1 \rightarrow T_n \geq 1$) com $\Phi = 0,7$ (35). O decaimento não radioativo do estado triplete excitado é patente, 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 triplete excitado sofre reação bimolecular com diversos substratos (35, 36). Assim, como o potencial de redução é deslocado de $-0,3V$ para a riboflavina no estado fundamental à $1,7V$ vs. NHE para seu estado triplete excitado, pode-se dizer que a riboflavina passa a ser um potente oxidante quando fotoexcitada (36). Desta forma, a transferência de elétrons do substrato para o estado triplete excitado leva a formação do radical ânion semiquinona da riboflavina $Rib^{\cdot-}$ ($pK_a \sim 8$) ou, dependendo do pH do meio reacional e mecanismo de reação (ET ou HAT, SPLET ou PCET), forma-se o radical semiquinona da riboflavina $RibH^{\cdot}$ ($E = -0,1V$). O radical semiquinona pode então ser oxidado pelo oxigênio molecular levando a formação do íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e posteriormente via reação de dismutação formar o radical hidroperoxila ($HOO^{\cdot-}$; $pK_a = 4,8$) ou peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, como o oxigênio permanece no estado fundamental (biradical), reações de recombinação com radicais fotoinduzidos ocorrem rapidamente formando radicais peroxila reativos ($ROO^{\cdot}$), os quais podem promover danos em biomoléculas (33).

O oxigênio molecular, 3O_2 , também é um conhecido supressor do estado triplete excitado da riboflavina ($k = 9,8 \cdot 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) produzindo oxigênio singlete excitado ($^1O_2^*$)³, o qual está envolvido em vários processos

³ O reativo estado singlete excitado do oxigênio formado por transferência de energia, é comumente denotado de $^1\Delta O_2$ e possui um dos dois orbitais π degenerados ocupados ($\pi \uparrow \downarrow$) e apresenta energia $22,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ superior ao estado fundamental. Desta forma, seu relativo longo tempo de meia vida ($3,6 \mu\text{s}$ em água), eletrofilicidade e a não violação de spin promovem o aumento da reatividade frente a substratos orgânicos quando comparado ao oxigênio no estado fundamental triplete (37).

oxidativos através de reações do tipo ene e cicloadição (37).

As reações envolvendo oxigênio singlete excitado via fotoquímica são geralmente referidas como fotoreação do Tipo II, enquanto que a direta interação do estado triplete da riboflavina excitada ($^3\text{Rib}^*$) com o substrato é conhecida como fotoreação do Tipo I. A **Figura 7** ilustra as reações de fotossensibilização (Tipo I e Tipo II) os quais a riboflavina pode estar envolvida em meio biológico (22).

Figura 7. Esquema do mecanismo de fotooxidação do Tipo I e Tipo II.

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é investigar a degradação fotosensibilizada do ácido fólico pela riboflavina visando o conhecimento do mecanismo reacional, Tipo I (radicalóide) ou Tipo II ($^1\text{O}_2$), em alimentos contendo ambas as vitaminas. Para alcançar este objetivo, o trabalho foi dividido em etapas:

- Etapa 1: determinar o rendimento quântico de fotodegradação do ácido fólico sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de oxigênio, em meio aquoso e de óxido de deutério;
- Etapa 2: identificação dos fotoprodutos majoritários;
- Etapa 3: estudo cinético da desativação dos estados singlete e triplete excitados da riboflavina pelo ácido fólico;
- Etapa 4: determinação do potencial de oxidação do ácido fólico e as características do processo eletroquímico;

3. Procedimento experimental

3.1. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados para realizar os experimentos estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Reagentes e solventes utilizados.

Reagentes/Solventes	Procedência
Água deionizada (18,2 MΩ. cm a 25 °C)	Sistema Milli-Q (Milipore)
Água deuterada	Aldrich
Ácido Fórmico 98-100%	Merck
Ácido acético (HPLC)	Tedia
Ácido clorídrico 36-38%	J. T. Baker
Ácido fólico 98%	Sigma Aldrich
Acetonitrila (HPLC)	J. T. Baker
Cloreto de sódio 99,7%	Mallinckrodt
Hidróxido de potássio (ACS)	J.T.Baker
Riboflavina 98%	Acros
K ₂ HPO ₄ 99,5%	J.T.Baker
KH ₂ PO ₄ 99,7%	J.T.Baker
Fenantrolina	QHEMIS
Oxalato de potássio	Reagen (Quimibras)
Cloreto de ferro III.(6H ₂ O)	Merck
Metanol (HPLC)	Tedia

3.2. Preparação do sal de Parker K₃[Fe(C₂O₄)₃].3H₂O (38)

Foram dissolvidos 120g de oxalato de potássio em 200 mL de água deionizada. Separadamente, também foram dissolvidos 82g de cloreto de ferro III. 6H₂O em 800 mL de água deionizada. Aqueceram-se estas duas soluções

até 60°C que em seguida foram misturadas e resfriadas a 0°C em banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com metanol gelado. Este, já lavado, foi dissolvido em 200 mL de água deionizada e aquecido até 60°C onde foi novamente resfriado a 0°C. Repetiu-se o procedimento de filtração a vácuo e a lavagem com metanol gelado. Transferiu-se o sólido para um béquer o qual foi deixado no dessecador por duas horas (sob vácuo) e posteriormente foi determinada a quantidade de água de cristalização do Sal de Parker por gravimetria. Após este procedimento, preparou-se uma solução 0,15 mol L⁻¹ do sal obtido utilizando como solvente uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico.

3.3. Fotólise.

Os experimentos de fotólise na presença e ausência de oxigênio e em solvente deuterado (D₂O), e de uma mistura de ácido fólico 1.10⁻³ mol L⁻¹ com a riboflavina 1.10⁻⁵ mol L⁻¹, tampão fosfato com C_H⁺=10^{-7,0} mol L⁻¹, foram realizados em uma bancada fotoquímica fabricada pela Oriel empregando-se radiação luminosa contínua, lâmpada de Hg de alta pressão, com comprimento de onda apropriado selecionado por filtros de interferência (440 nm). O cálculo da intensidade de radiação incidente pelo uso de actinômetro químico (K₃[Fe(C₂O₄)₃], tris(oxalato) ferrato(III) de potássio, 0,15 mol L⁻¹) seguiu o procedimento descrito na literatura (38).

3.4. Determinação do rendimento quântico.

Preparou-se uma solução aquosa de ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e riboflavina $1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato com $C_H^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ tanto em água deionizada quanto em óxido de deutério. Estas soluções foram irradiadas por 30 minutos utilizando-se a mesma bancada fotoquímica já citada. Repetiu este mesmo procedimento para as mesmas soluções só que estas agora foram desaeradas com argônio (5.0). Fez-se a quantificação analítica do ácido fólico 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. Utilizou-se como fase móvel: fase A- água/ácido acético 2% (v/v) com pH ajustado a 2,8 com hidróxido de potássio e a fase B acetonitrila. A coluna utilizada foi Waters spherisorb C-18 com dimensões 4,6 x 250 mm. O gradiente de eluição utilizado está na **Tabela 3**. O fluxo utilizado foi de $0,4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL . Com os valores de intensidade da luz e o número de mols do ácido fólico determinou-se o valor do rendimento quântico.

Tabela 3. Gradiente de eluição utilizado na quantificação do ácido fólico fotodegradado

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

3.5. Determinação dos principais fotoprodutos.

Utilizou-se a solução de riboflavina e ácido fólico descrita acima. A identificação dos fotoprodutos majoritários formados na fotólise foi feita 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. Utilizou-se um divisor de fluxo na interface HPLC/MS, cujo fluxo que chegou até o espectrômetro de massas foi de $150 \mu\text{L min}^{-1}$. Condições de nebulização: pressão 40 psi; fluxo do gás (N_2) 9 L min^{-1} ; temperatura 365°C . Voltagem do capilar: 3500 V. Para detecção utilizou 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 $0,3 \text{ mL.min}^{-1}$ e a coluna para separação foi a Agilent C-18 ($5\mu\text{m}$; $2,1 \times 150 \text{ mm}$). O gradiente de eluição utilizado é descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4. 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

3.6. Desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo ácido fólico.

O monitoramento espectroscópico foi efetuado em um fluorímetro Hitachi modelo F-4500, utilizando-se as soluções de riboflavina e de ácido fólico cujas concentrações analíticas encontram-se descritas na **Tabela 5**. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico para o da intensidade da emissão molecular com comprimento de onda de excitação de 440nm. A velocidade de escaneamento foi de 1200 nm min⁻¹. A abertura da fenda de excitação foi de 5 nm e da fenda de emissão de 10 nm.

Tabela 5. Concentrações analíticas utilizadas nos experimentos de supressão de emissão molecular das soluções de riboflavina e ácido fólico em meio aquoso tampão fosfato 5.10⁻³mol L⁻¹ com C_{H⁺}=10^{-7,0} mol L⁻¹ e I=0,2.

[Riboflavina]	[Ácido Fólico]
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	0
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	2,5.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	5,0.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	7,5.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	10,0.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	12,5.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
1.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	15,0.10 ⁻⁴ mol L ⁻¹

3.7. Desativação do estado triplete excitado da riboflavina pelo ácido fólico.

Para tanto fez-se uso da técnica de fotólise por pulso de laser resolvida no tempo em um espectrômetro LKS.50 da Applied Photophysics Ltd. usando a terceira harmônica (355nm) de um *laser* de Nd:YAG da Spectrum Laser System atenuado a 10 mJ. cm^{-2} como fonte de excitação com resolução temporal de 10 ns. Um tubo fotomultiplicador R928 da Hamamatsu Photonics foi utilizado para detectar a absorção do transiente (300 – 800nm). Foram utilizados filtros de corte apropriados para UV a fim de minimizar a degradação da amostra com monitoramento da luz. A amostra foi excitada em cubeta de fluorescência de 0,5 cm x 1,0 cm da Hellma. Cada traço cinético representa uma media de 16 varreduras independentes e as constantes de velocidade observada foram determinadas pelo ajuste não linear da equação $f(A) = \exp^{-kt} + C$ aos dados com o auxílio do software MatLab R2008. Todos os experimentos foram realizados com soluções termostatizadas a $298 \pm 0,5 \text{ K}$ e previamente saturadas com N_2 (5.0) por 30 minutos antes do experimento.

3.8. Determinação do potencial de oxidação do ácido fólico.

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial de uma solução aquosa de ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $5.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com $\text{C}_{\text{H}^+} = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica $I=0,2$ (ajustada com NaCl). Os experimentos foram realizados em uma cela eletroquímica com três eletrodos sob atmosfera de nitrogênio. O equipamento

Procedimento experimental

utilizado foi o AutoLab modelo PGSTAT100 operando com o software GPES (AutoLab). Os eletrodos utilizados foram: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e platina (contra-eletrodo).

4. Resultados e Discussão

A fim de determinar o mecanismo, Tipo I ou II, de fotooxidação do ácido fólico sensibilizado pela riboflavina, as constantes de velocidade bimoleculares de desativação do estado singlete e triplete excitados da riboflavina foram determinadas por emissão molecular no estado estacionário e espectroscopia de absorção molecular de transientes por fotólise de pulso de laser, respectivamente. A **Figura 8** ilustra o espectro eletrônico de absorção de uma solução aquosa tampão fosfato $5.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com $C_{H^+} = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ contendo ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e riboflavina $1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se claramente que apenas a riboflavina apresenta absorção em comprimento de onda superior a 400 nm.

Figura 8. Espectro eletrônico da solução de ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e riboflavina $1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato com $C_{H^+} = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica de $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ (NaCl).

A **Figura 9** ilustra o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações de ácido fólico ($2,5$ a $15,0.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ mol L^{-1}). A leitura do espectro da **Figura 9** indica que a intensidade de emissão de

fluorescência da riboflavina singlete excitada diminui com o aumento da concentração de ácido fólico em solução.

Figura 9. Espectro de emissão de fluorescência de uma solução aquosa de $1.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de riboflavina na presença de diferentes concentrações de ácido fólico em tampão fosfato com $\text{C}_{\text{H}^+} = 10^{-7.0} \text{ mol L}^{-1}$. Comprimento de onda excitação de 440nm com largura de fenda de 5 nm e a emissão monitorada em 530nm com largura de fenda de 10 nm.

Através dos valores de intensidade de fluorescência na ausência do supressor (I_0) e da intensidade de fluorescência na presença de crescentes concentrações analíticas do supressor (I) obtidos pelo espectro da **Figura 9**, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica de ácido fólico, **Figura 10**, e através da equação de Stern-Volmer pode-se calcular o valor da constante de desativação do estado singleto excitado da riboflavina pelo ácido fólico:

$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [M] = 1 + K_d [M]$$

onde:

I_0 = intensidade de fluorescência na ausência do supressor, onde o supressor é o ácido fólico;

I = intensidade de fluorescência na presença do supressor;

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

τ_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.

Figura 10. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina singleto excitada em tampão fosfato $C_{H^+} = 10^{-7,0}$ mol L⁻¹ por ácido fólico.

Sabendo que o tempo de vida, τ_0 da riboflavina singleto excitada é de 5,75 ns (33) e que o valor do coeficiente angular (b) do gráfico de Stern-Volmer, **Figura 10**, é 276,86 obteve-se constante de velocidade bimolecular de desativação (1k_q) do estado singleto excitado de $(4,8 \pm 0,1)10^{10}$ L.mol⁻¹.s⁻¹, o qual sugere um processo controlado por difusão e um indicativo de formação de um complexo no estado fundamental. Neste caso a desativação do estado singleto

excitado é atribuída a um processo de transferência de elétrons redutiva foto-induzida do folato no estado fundamental para a riboflavina no estado singlete excitado (19).

A desativação do estado excitado triplete da riboflavina por ácido fólico foi estudado por espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser. Primeiramente foi registrado o espectro da diferença de absorbância do estado triplete excitado da riboflavina (T-T) 0,2s após o pulso de laser de 355 nm (energia $\approx 3 \text{ mJcm}^2$) com duração de 8 ns, **Figura 11**, onde verifica-se o máximo de absorção do estado triplete excitado em 720nm. O espectro, **Figura 11**, apresenta-se similar ao previamente reportado (31-33,39) para o estado tripleto da riboflavina em solvente 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 da riboflavina no seu estado fundamental (*bleaching*).

Figura 11. Espectro eletrônico da ΔAbs do estado tripleto excitado da riboflavina (T-T) registrado 0,2s após o pulso de laser de 355 nm (8 ns) com energia $\approx 3 \text{ mJ.cm}^2$.

Monitorando-se o decaimento da banda de absorção T-T em 720 nm da riboflavina triplete excitada na ausência e na presença de diferentes concentrações de ácido fólico verifica-se que o decaimento da riboflavina triplete

ocorre exponencialmente e é acelerado pela presença de ácido fólico, **Figura 12**. Conforme ilustrado na **Figura 11** a banda centrada em 720 nm foi escolhida para o monitoramento do estado triplete visto que se apresenta como a banda de maior intensidade e em uma região espectral pouco sujeita a interferentes.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem foram calculadas através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, $\Delta\text{Abs}(t) = B \cdot \exp(-kt) + \Delta_{\infty}$, às curvas de decaimento do estado triplete metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, **Figura 12**.

Figura 12. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor (ácido fólico). Solução aquosa de tampão fosfato $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ saturada com Ar e pH ajustado para 7 (força iônica = 0,2) contendo $70 \mu\text{M}$ de riboflavina (pulso de laser de 355 nm com energia de 6mJ.cm^{-2}).

Graficando os valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem *versus* à concentração do supressor, **Figura 13**, foi possível calcular as constantes de velocidade específica para a desativação através do coeficiente angular obtido da linearização do gráfico:

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

onde, k_{obs} é a constante observada de pseudo-primeira ordem, k_0 é a constante de velocidade de decaimento natural do estado triplete metaestável da

riboflavina, k_q é a constante de velocidade de segunda-ordem específica e [supressor] é a concentração molar do supressor.

Figura 13. Gráfico de k_{obs} versus [ácido fólico].

Os valores das constantes de velocidade específica obtidas foram: $^3k_q = (4,8 \pm 0,1) \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O valor de 3k_q também está próximo ao do limite difusional, assim como o valor de 1k_q . Ao comparar a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pelo folato com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da riboflavina por oxigênio molecular ($9,8 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), verifica-se que ambos são competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento em termos de teores de ácido fólico, oxigênio dissolvido, e da presença de outro supressores (31,35,36).

Com os valores das constantes calculadas acima, conclui-se que o folato pode reagir com ambos os estados singlete e triplete excitado da riboflavina. Para as concentrações de riboflavina e folato de relevância para produtos lácteos e a maioria dos outros alimentos, a reatividade do estado triplete excitado torna-se mais importante que a reatividade do estado singlete

excitado já que a concentração necessária do ácido fólico para obstruir em 95 % a formação do estado triplete excitado é ao redor de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

No intuito de se determinar o potencial de oxidação do ácido fólico e de definir o número de elétrons envolvido neste processo, foram realizados experimentos de voltametrias cíclica e de pulso diferencial. A janela de potencial utilizada foi de 0,0 a 1,1V vs. ECS. Os voltamogramas obtidos com diferentes velocidades de varredura (10, 20, 50, 100, 200 e 500 mV s^{-1}) encontram-se na

Figura 14.

Figura 14. Voltamogramas Cíclicos do ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+=10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I=0,2$ utilizando os seguintes eletrodos: calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). As velocidades de varredura utilizadas foram: a=10, b=20, c=50, d=100, e=200 e f=500 mV s^{-1} .

Analisando os dados contidos na **Figura 14**, verifica-se que o potencial de pico de oxidação do ácido fólico é de 0,90V *versus* SCE e a ausência de onda na varredura catódica sugere um processo irreversível. Também pode ser verificado que os potenciais de pico deslocam com o aumento da velocidade de varredura. A fim de verificar o processo que ocorre no 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 15**.

Figura 15. Corrente de pico anódica *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura da solução de ácido fólico $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $C_H^+ = 10^{-7.0} \text{ mol L}^{-1}$.

Através da leitura da **Figura 15** verifica-se uma dependência linear da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade, com coeficiente de correlação igual a 0,9964 evidenciando um processo difusional, cujo o transporte de massa na oxidação do ácido fólico é controlado cineticamente por transferência heterogênea de elétrons do substrato para o eletrodo. Ademais, o alto valor do coeficiente angular da equação de reta de 93,6 mV e um deslocamento de aproximadamente 100mV por década evidencia um processo de transferência de elétrons irreversível.

A fim de se determinar o número de elétrons envolvido, foram realizados experimentos de voltametria de pulso diferencial (VDP) por ser mais sensível que a voltametria cíclica, proporcionando um aumento na sensibilidade da resposta eletroquímica da espécie eletroativa. As VPD da solução $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de

ácido fólico preparada em tampão fosfato com $C_{H^+}=10^{-7,0}$ mol L⁻¹ e $I=0,2$ foram realizadas com velocidade de varredura anódica de 10 e 30 mV s⁻¹ e potencial de *stand-by* de 0,0 V *versus* ECS, **Figura 16**.

Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial do ácido fólico 1.10^{-3} mol L⁻¹ em tampão fosfato $C_{H^+}=10^{-7,0}$ mol L⁻¹ e $I=0,2$. Varredura: 0,0 a 1,1V vs ECS. Potencial de *stand-by* 0,0 V. Os eletrodos utilizados foram calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). Velocidades de varredura utilizadas: a=10 mV s⁻¹ e amplitude modular de 25mV, b=10 mV s⁻¹ e amplitude modular de 100mV e c=30 mV s⁻¹ e amplitude modular de 100mV.

A **Figura 16** ilustra o gráfico de $I(A)$ *versus* E onde as VDP foram obtidas utilizando duas amplitudes de modulação (25 e 100 mV) podendo-se verificar que quanto maior esta, maior a intensidade e menor a resolução. Pode-se verificar a presença de um único processo anódico e não dois como o observado na voltametria cíclica quando operando em baixas velocidades de varredura. Este fato sugere que a presença de duas ondas na voltametria cíclica quando esta realizada com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ ocorre em função da polarização do eletrodo e não da presença de um segundo processo acoplado.

Para confirmar a existência de dois elétrons no processo de oxidação do ácido fólico, foi realizado mais um experimento utilizando voltametria cíclica. Este experimento adicional foi realizado com uma solução de $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ácido fólico e de uma solução $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do íon complexo hexacianoferrato, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Os voltamogramas obtidos encontram-se na **Figura 17**.

Figura 17. Voltamogramas cíclicos da mistura de (b) ácido fólico $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de (a) hexacianoferrato $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ feito em tampão fosfato $\text{C}_\text{H}^+ = 10^{-7,0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I = 0,2$ e a velocidade de varredura utilizada foi de 100 mVs^{-1} . Os eletrodos utilizados foram calomelano saturado (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo).

Sabidamente, o íon complexo hexacianoferrato apresenta um processo anódico reversível com uma onda bem definida envolvendo um número de elétrons igual a um (39). Observa-se pela leitura da **Figura 18**, que a relação entre a área do ácido fólico ($1,3 \cdot 10^{-6}$) e a do hexacianoferrato ($7,5 \cdot 10^{-7}$) é de 1,85. Portanto pode-se inferir que o ácido fólico sofre um processo de oxidação onde estão envolvidos dois elétrons.

Figura 18. Figura indicando a comparação das áreas das soluções de ácido fólico $5.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de hexacianoferrato $5.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ feitas em tampão fosfato $C_{H^+} = 10^{-7.0} \text{ mol L}^{-1}$ e $I = 0,2$ e a velocidade de varredura utilizada foi de 100 mVs^{-1} .

Com o intuito de obter-se informações sobre a transferência de elétrons procurou-se obter dados termodinâmicos. A diferença de energia livre padrão de Gibbs, ΔG° , para uma reação de transferência de elétrons é expressa pela equação de Rehm-Weller:

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

onde os termos mais importantes estão relacionados ao potencial de ionização do doador (E_{ox}^D), a afinidade eletrônica do aceitador (E_{red}^A); o fator coulômbico

em função do solvente (e^2/ϵ_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 singlete, o valor de $\Delta E_{0,0} = 239,3 \text{ KJ mol}^{-1}$ (33);

para o estado triplete, o valor de $\Delta E_{0,0} = 208,2 \text{ KJ mol}^{-1}$ (33);

O potencial de oxidação do ácido fólico foi obtido através de dados de voltametria cíclica e o potencial de redução da riboflavina retirado da literatura (33).

$E_{ox} = 1,01 \text{ V vs NHE}$ (ácido fólico)

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

Com os valores acima calculou-se os valores de ΔG° :

$$\Delta G^\circ_{ET-S} = - 113,9 \text{ KJ mol}^{-1}$$

$$\Delta G^\circ_{ET-T} = - 82,8 \text{ KJ mol}^{-1}$$

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 (40). Os valores negativos de ΔG° obtidos indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente.

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

Desta forma, foi feito uso do método actinométrico para o cálculo da intensidade do fluxo de radiação da lâmpada, um dos passos para se determinar

o rendimento quântico. Utilizou-se o actinômetro químico ferrioxalato de potássio $K_3[Fe(C_2O_4)_3]$, o qual é um actinômetro bastante sensível e exato na faixa de 253-577nm. O íon complexo $[Fe(C_2O_4)_3]^{3-}$ ao ser irradiado sofre as seguintes reações químicas:

Assim, a quantidade de íons de Fe(II) gerada é determinada espectrofotometricamente a 510 nm através da complexação com 1,10-fenantrolina e é proporcional o numero de fótons absorvidos pelo actinômetro. A intensidade da radiação luminosa é dada pela expressão:

$$I = \frac{\Delta A \times V_1 \times V_3}{\epsilon_{Fe} \times t \times d \times V_2 \times f \times \Phi_{Fe}}$$

onde:

ΔA = diferença da absorbância a 510 nm da solução actinométrica irradiada e da absorbância a 510 nm do branco;

d = largura da cubeta utilizada para a medida de absorbância;

ϵ_{Fe} = coeficiente de absorção do complexo ferro 1-10 fenantrolina em 510 nm ($\sim 1,11 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (41);

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) (41);

Φ_{Fe} = rendimento quântico de formação do íon Fe^{2+} no comprimento da luz irradiada (para o comprimento de onda utilizado $\lambda= 440nm$, o valor de $\Phi_{Fe}= 1,01 \text{ mol.Einstein}^{-1}$)(41);

O valor médio da intensidade da radiação luminosa calculada para os experimentos de fotólise contínua encontra-se descrito na **Tabela 6**:

Tabela 6. Valores médios da intensidade da radiação luminosa obtida.

Intensidade da radiação luminosa (mol Einstein⁻¹)
2,70.10 ⁻⁷
2,70.10 ⁻⁷
2,77.10 ⁻⁷
2,79.10 ⁻⁷

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

nº de fótons = Intensidade da radiação luminosa x tempo de irradiação
da amostra (minutos)

Desta maneira, a determinação quantitativa do teor de ácido fólico remanescente após a fotólise de uma solução de riboflavina com ácido fólico por 30 minutos, com irradiação luminosa em 440nm, permitiu o cálculo do rendimento quântico de degradação do ácido fólico sensibilizado pela riboflavina, 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 ácido fólico sensibilizada pela riboflavina encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7. Rendimento quântico obtido pela fotólise da solução de ácido fólico e riboflavina *

O ₂ /H ₂ O	Ar/H ₂ O	O ₂ /D ₂ O	Ar/D ₂ O
0,27	0,32	0,37	0,37
0,26	0,32	0,36	0,37
0,26	0,32	0,37	0,38
0,263 ± 0,003	0,32	0,367 ± 0,003	0,373 ± 0,003

* A solução de ácido fólico e riboflavina foi feita em: meio aeróbico aquoso (O₂/H₂O) e óxido de deutério (O₂/D₂O); e também em meio anaeróbico aquoso (Ar/H₂O) e óxido de deutério (Ar/D₂O) deaerados com argônio (5.0).

Ao comparar o rendimento quântico das soluções em meio aquoso (solução aeróbica e a anaeróbica), verifica-se um maior rendimento para a solução anaeróbica, indicando que o mecanismo reacional do Tipo I (radicalóide) é predominante no processo de degradação do ácido fólico. Já ao comparar as soluções feitas em meio de óxido de deutério, verifica-se que não houve diferença significativa nos valores obtidos verificando-se mais uma vez uma competição entre os mecanismos reacionais Tipo II. Sabe-se que o ¹O₂ apresenta um tempo de vida maior em solvente deuterado quando comparado ao solvente aquoso (aproximadamente 10 vezes). O efeito protetor do oxigênio como visto no menor rendimento quântico para soluções saturadas de ar do que o previsto para condições anaeróbicas é explicado por uma competitiva desativação da riboflavina triplete excitada pelo oxigênio ($k = 9,8 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ao formar oxigênio singlete excitado por transferência de energia.

Não foi observada diferença significativa nos rendimentos quânticos de fotodegradação sensibilizada em meio aquoso e de óxido de deutério, o que

juntamente com o menor rendimento quântico de fotodegradação em meio aeróbico, sugerem a predominância do mecanismo do Tipo I, radicalóide, na degradação fotoinduzida do ácido fólico sensibilizada pela riboflavina.

A identificação dos principais produtos formados a partir da fototodegradação do ácido fólico sensibilizado riboflavina, foi realizada análise através da solução fotodegradada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de múltiplo estágio (LC-ESI-MS/MS) com fonte de ionização por eletrospray (ESI). A **Figura 19** ilustra um cromatograma de íon total típico obtido para a amostra de ácido fólico 1.10^{-3} mol L⁻¹ e riboflavina 1.10^{-5} mol L⁻¹ irradiada com luz monocromática (440nm) por 30 minutos ($I \cong 2,7 \cdot 10^{-7}$ mol einstein⁻¹) em uma bancada fotoquímica da marca Oriel.

Figura 19. Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada de ácido fólico e riboflavina: A) operando no modo de detecção negativo e B) operando no modo de detecção positivo.

Verifica-se pela análise da **Figura 19** que quase todos os picos eluídos e visualizados no modo de ionização negativo se repetem no modo positivo,

entretanto os picos 7 e 8 apareceram somente no modo de detecção de íons positivo.

Com intuito de se obter informações sobre os compostos eluídos em cada pico cromatográfico registrou-se os espectros de massas (ESI-MS) de cada pico obtido pelo cromatograma total dos íons (TIC) da solução fotodegrada de ácido fólico e riboflavina nos modos de detecção de íons positivo e negativo. A **Figura 20** ilustra os espectros de massas obtidos.

A- ESI (-)

B- ESI (+)

(continua na pag. 57)

(continuação da figura)

(conclusão da figura)

Figura 20:

- 1)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 1 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 2)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 2 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 3)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 3 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 4)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 4 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 5)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 5 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 6)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 6 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, nos modos de detecção positivo (A) e negativo (B).
- 7)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 7 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, no modo de detecção positivo (A).
- 8)Espectro de massas (ESI-MS) referente ao pico 8 do cromatograma total dos íons (TIC) da Figura 19, no modo de detecção positivo (A).

A análise da **Figura 20-1**, referente ao espectro de massas (ESI-MS) do pico 1 o qual apresenta $t_r = 3,2$ minutos, revela a existência do íon pseudo-molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 206$ e $[M+H]^+$ com $m/z = 208$ sugerindo a presença de um composto com massa molecular de 207 Da. A **Figura 21** contém o espectro de massas do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 208$ m/z após seleção e fragmentação por CID.

Figura 21. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon 208 m/z referente ao pico 1 da **Figura 19** com $t_r = 3,1$ minutos.

Ao analisar o espectro da **Figura 21**, verifica-se a existência dos íons fragmento com m/z 192 e 164 com mesmos tempos de retenção podendo sugerir que ambos são fragmentos do íon m/z 208. As **Figuras 22 e 23** ilustram os espectros de MS^3 obtidos após seleção e fragmentação por CID dos íons m/z 192 e 164 respectivamente. Observa-se que o íon com m/z 164 é íon fragmento do íon com m/z 192 gerado inicialmente do íon pseudo-molecular 208 m/z .

Figura 22. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 208→192→varredura do íon fragmento referente ao pico 1 da Figura 19.

Figura 23. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 208→164→varredura do íon fragmento referente ao pico 1 da Figura 19.

Verificou-se que os tempos de retenção destes dois íons foram o mesmo do íon 208 ($t_r=3,1$ e $3,2$ min). Através da análise dos espectros contidos nas **Figuras 22 e 23** destes experimentos pode-se inferir que ambos os íons de $m/z=164$ e 192 são fragmentos do íon 208 ($[M+H]^+$) sendo referentes a perda de água $[M+H-H_2O]^+$ e da descarboxilação $[M+H-HCOOH]^+$, respectivamente. Portanto, como o composto eluído sugere uma massa molecular de 207 daltons, ou seja, uma perda de 235 daltons referente ao ácido fólico presente na amostra e seu espectro de fragmentação por CID infere perda de grupo carboxílico e água; ou seja perda do grupo p-amino-benzoil-glutamato com adição de 32 Da referente a oxidação do C(9) do grupo pterina a ácido carboxílico. Podemos concluir que o pico 1 é referente a 6-carboxipterina, um conhecido fotoproduto do ácido fólico (17,18,19,20,42). O esquema da fragmentação do íon pseudo-

molecular 208 m/z (6-carboxipterina) levando a formação dos íons fragmentos 163 e 191 m/z encontra-se ilustrado na **Figura 24**.

Figura 24. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 208 m/z originando os íons fragmento 164 e 192 m/z.

A **Figura 20-2**, refere-se aos espectros de massas (ESI-MS) do pico 2 eluindo com $t_r = 3,8$ minutos. Verifica-se a existência do íon pseudo-molecular $[M+H]^- = 265 \text{ m/z}$ e do íon $[M+H]^+ = 267 \text{ m/z}$, o que sugere um composto de massa molecular de 267 Da, ou seja, uma perda de 175 Da podendo ser atribuída ao grupo p-aminobenzoil-glutamato do ácido fólico inicialmente presente na amostra não irradiada. No intuito de se obter maiores informações sobre o composto com $t_r = 3,8$ minutos, realizou-se a fragmentação por CID do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 267 \text{ m/z}$, o qual pode ser visualizado na **Figura 25**.

Figura 25. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS do íon pseudo-molecular 267 m/z referente ao pico 2 da **Figura 19** com $t_r = 3,8$ minutos.

O espectro de massas ESI(+)MS/MS do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 267$ m/z submetido a fragmenta por CID fornece majoritariamente o íon fragmento 120 m/z $[C_7H_6ON]^+$, característico para a parte p-aminobenzoil da molécula o qual pode ser referente a quebra na porção p-aminobenzoil do AF. Portanto, podemos concluir que o pico 2 é referente ao fotoproduto do ácido fólico conhecido como p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico (17,18,19,20,42). A **Figura 26** ilustra a sua fragmentação gerando-o.

Figura 26. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 266 m/z gerando o íon fragmento 120 m/z.

Já a **Figura 20-3** refere-se ao espectro de massas referente ao pico 3, com $t_r = 5,8$ minutos, que por adição sucessiva de padrão e comparação dos tempos de retenção remete ao ácido fólico. Verifica-se a existência do íon pseudo-molecular $[M+H]^- = 440$ m/z e $[M+H]^+ = 442$ m/z (modo de detecção de íons negativo e positivo, respectivamente). No modo de detecção de íons positivo verifica-se a existência dos íons 313, 295 e 148 de m/z. Com o intuito de obter-se maiores informações sobre o padrão de fragmentação do ácido fólico foram realizadas as análises ESI/MS/MS através do isolamento e fragmentação por CID dos íons de interesse.

Figura 27. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 295 m/z e t_r = 5,7 minutos referente ao pico 3 da **Figura 19**.

Analisando a **Figura 27**, verifica-se o que o íon 295 m/z submetido a fragmentação por CID promove a formação dos íons fragmentos 120 e 176 m/z sugerindo que os íons 295 e 148 m/z do espectro de massas do ácido fólico estão relacionados a clivagem da ligação amídica do ácido fólico.

A **Figura 28** refere-se ao espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon 313 m/z (com o mesmo tempo de retenção, t_r = 5,8 minutos), onde visualiza-se a formação dos íons fragmentos 295, 120 e 176 m/z.

Figura 28. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 313 m/z e t_r = 5,8 minutos referente ao pico 3 da **Figura 19**.

A **Figura 29** refere-se ao espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon fragmento 148 m/z o qual foi selecionado e submetido a fragmentação por CID gerando os íons fragmentos 130 e 102 m/z.

Figura 29. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 148 m/z e $t_r = 5,8$ minutos referente ao pico 3 da **Figura 19**.

Portanto, após a análise dos espectros de fragmentação por CID pode-se inferir que o composto eluído de massa molecular 442 Da refere-se a molécula do ácido fólico e as fragmentações geradas por CID inferem quebra da ligação amídica do AF gerando os íons fragmentos 148, 295 e 312 m/z, como ilustrado na **Figura 30**.

Figura 30. Esquema da fragmentação do ácido fólico gerando os íons 313, 148 e 295 m/z.

Ao analisar o fragmentograma da **Figura 20-4** referente ao pico 4 do cromatograma de íons total, com $t_r = 6,7$ minutos, verifica-se a existência do íon pseudo molecular $[M+H]^+ = 375 \text{ m/z}$ e $[M+H]^+ = 377 \text{ m/z}$, sugerindo a presença de um composto com massa molecular de 376 Da que por sua vez pela análise do tempo de retenção e adição de padrão verifica-se que este é referente a riboflavina.

Para obter-se mais informações sobre a fragmentação da riboflavina foi realizado a fragmentação do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 377 \text{ m/z}$ após seleção e fragmentação por CID, o qual pode ser encontrado na **Figura 31**.

Figura 31. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 377 m/z referente ao pico 4 da **Figura 19** e $t_r = 6,7$ minutos.

Analisando o fragmentograma da **Figura 31**, pode-se inferir que os íons fragmentos 243 e 359 m/z são originados do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 377 \text{ m/z}$.

Portanto, ao analisar os dados dos fragmentos obtidos acima (após seleção e fragmentação por CID), pode-se inferir que o íon $m/z=377$ refere-se a molécula da riboflavina e que o íons 243 m/z são referentes a perda do grupo ribitol $[M+H-\text{ribitol}]^+$ e o íon 359m/z referente a perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]^+$, (**Figura 32**).

Riboflavina ($M = 376 \text{ g mol}^{-1}$)

Figura 32. Esquema da fragmentação da riboflavina levando a formação do íon fragmento $[M+H-\text{ribitol}]^+ = 243 \text{ m/z}$.

A **Figura 20-5** é referente ao espectro de massas do pico 5 ($t_r = 7,1$ minutos) do cromatograma de íon total da **Figura 19**. O espectro de massas operando no modos de detecção de íons positivos e negativos apresenta os íons pseudo-moleculares $[M+H]^- = 454 \text{ m/z}$ e $[M+H]^+ = 456 \text{ m/z}$, indicando a presença de um composto com massa molecular de 455 Da, que a princípio refere-se a um composto derivado do ácido fólico acrescido de 14 Da. A **Figura 33** contém o espectro de massas do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 456 \text{ m/z}$ após seleção e fragmentação por CID.

Figura 33. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 456 m/z referente ao pico 5 da **Figura 19** e $t_r = 7,1$ minutos.

Após analisar os íons fragmentos gerados, realizou-se a fragmentação MS^3 do íons de $m/z = 327$ e 309, a fim de se obter maiores informações, os

quais podem ser encontrados nas **Figuras 34 e 35**. Observa-se que o íon com m/z 309 é íon fragmento do íon com m/z 327 gerado inicialmente do íon pseudo-molecular 456 m/z .

Figura 34. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 456→327→varredura do íon fragmento referente ao pico 5 da **Figura 19** e $t_r = 7,2$ minutos.

Figura 35. Espectro de massas ESI(+)/MS/MS/MS da transição 456→309→varredura do íon fragmento referente ao pico 5 da **Figura 19** e $t_r = 7,1$ minutos.

Portanto, como o composto eluído possui uma massa molecular de 456 Da, ou seja, um ganho de massas de 14 Da referente ao ácido fólico e seu espectro de fragmentação por CID infere a perda da porção do ácido glutâmico $[M+H-\text{ácido-glutâmico}]^+$ e de uma molécula de água $[M+H-\text{ácido-glutâmico}-H_2O]^+$ na molécula do ácido fólico, podemos sugerir que o composto é produto da oxidação do ácido fólico a imina sem que ocorra clivagem e posterior oxidação da imina a oxaziridina que sofre isomerização formando o derivado estável α -aril nitrona, como ilustrado na **Figura 36**.

Figura 36. Esquema da fragmentação do íon pseudo-molecular 456 m/z levando a formação do íon fragmento 309 m/z.

A **Figura 20-6** corresponde ao espectro de massas do pico 6 do cromatograma de íon total da **Figura 19**, o qual apresenta tempo de retenção de 8,6 minutos. Verifica-se a existência do íon pseudo molecular $[M+H]^+ = 529$ m/z e $[M+H]^+ = 527$ m/z, sugerindo 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 AF. A **Figura 37** contém o espectro de massas do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 529$ m/z após seleção e fragmentação por CID.

Figura 37. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo molecular 529 m/z referente ao pico 6 da **Figura 19** e $t_r = 8,7$ minutos.

A fragmentação do íon de $m/z = 529$ gerou os íons fragmentos 253, 400 e 382 m/z. Os dados dos fragmentos obtidos acima não foram suficientes para propor uma estrutura ao composto referente ao íon 529 m/z, sendo necessários investigação futura com auxílio do isolamento do fotoproduto por cromatografia

semi-preparativa para posterior análise de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução.

Ao analisar o fragmentograma apresentado na **Figura 20-7** referente ao pico 7 do cromatograma de íons total, com $t_r = 12,1$ minutos, verifica-se a existência do íon pseudo molecular $[M+H]^+ = 359$ m/z.

A **Figura 38** ilustra o espectro de massas do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 359$ m/z após seleção e fragmentação por CID.

Figura 38. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 359 m/z referente ao pico 7 da **Figura 19** e $t_r = 12,1$ minutos.

Entretanto, devido a falta de informações após se analisar os dados dos fragmentos obtidos, não foi possível atribuir a possível estrutura química para o composto referente ao pico 7.

O último pico obtido no cromatograma total de íons **Figura 19** pode ser visto na **Figura 20-8**, o qual apresenta tempo de retenção de 19,1 minutos. Este pico também foi verificado somente no modo de detecção de íons positivo. Verifica-se a existência do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 301$ m/z. A **Figura 39** contém o espectro de massas do íon pseudo-molecular $[M+H]^+ = 301$ m/z após seleção e fragmentação por CID.

Figura 39. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS do íon pseudo-molecular 301 m/z referente ao pico 8 da **Figura 19** e $t_r = 19,1$ minutos.

A fim de se obter informações adicionais a respeito da estrutura do composto foi realizado o MS³ do íon fragmento 245 o qual pode ser encontrado na **Figura 40**.

Figura 40. Espectro de massas ESI(+)-MS/MS/MS da transição 301→245→varredura do íon fragmento referente ao pico 8 da **Figura 19** e $t_r = 18,9$ minutos.

Portanto, devido a falta de dados referentes a fragmentação, não foi possível atribuir a estrutura química do composto referente ao pico 8.

Contudo, com todos os dados obtidos foi possível propor um mecanismo reacional para a fotodegradação do ácido fólico sensibilizado pela riboflavina o qual pode ser encontrado no **Esquema 1**.

A Riboflavina (Rib) ao absorver fóton atinge o estado singlete (¹Rib*) e através de um eficiente cruzamento intersistemas, $\Phi = 0,7$, forma o estado tripleto excitado ($\tau \cong 15 \mu s$). O estado tripleto excitado, ³Rib*, por sua vez abstrai

um elétron do ácido fólico (AF(1)) levando a formação da espécie radical do AF (2) e gerando o radical riboflavina. Este radical riboflavina na presença de oxigênio molecular regenera a riboflavina e pode formar o ânion superóxido que por dismutação leva a formação de peróxido de hidrogênio, como ilustrado no

Esquema 2.

Esquema 2. Ilustração da formação do radical do AF.

A espécie radical do AF (2) pode então ser oxidada por um elétron seguido da deprotonação formando uma imina derivada do AF (3), como ilustrado no **Esquema 3**.

Esquema 3. Ilustração da formação da imina derivada do AF.

A imina (3) derivada da oxidação do ácido fólico por dois elétrons pode sofrer dois processos:

1) hidrólise, promovendo a quebra da ligação C(9)-N(10) levando a formação de p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico (6) e 6-formilpterina (7). A 6-formilpterina (7) por sua vez pode sofrer oxidação formando a 6-carboxipterina (8), como ilustrado no **Esquema 4**.

Esquema 4. Ilustração da formação dos produtos da hidrólise da imina derivada do AF.

2) oxidação, levando a formação de uma oxaziridina (4), que isomeriza a estáveis α -aril nitrona (5), **Esquema 5**.

Esquema 5. Ilustração da formação dos produtos da oxidação da imina derivada do AF.

Esquema 1. Mecanismo reacional proposto para a fotooxidação do ácido fólico sensibilizado pela riboflavina.

5. Conclusão

Os valores das constantes de velocidade específicas de desativação dos estados excitados singlete e triplete da riboflavina por ácido fólico, são próximas do limite da difusão e são competitivas com o fotoprocesso do Tipo II, em alimentos, onde ocorre a formação de $^1\text{O}_2^*$.

Não foi observada diferença significativa nos rendimentos quânticos de fotodegradação sensibilizada por flavinas em meio aquoso e em óxido de deutério, que em conjunto com o menor rendimento quântico de fotodegradação observado em meio aeróbico, sugere a prevalência do mecanismo do Tipo I (radicalóide) na degradação fotoinduzida do ácido fólico sensibilizada pela riboflavina.

Os principais produtos da fotólise identificados foram: p-aminobenzoil-L-ácido glutâmico, 6-carboxipterina e a oxaziridina derivada do ácido fólico.

O presente trabalho deixa patente a necessidade de atenção às condições de embalagem e estocagem para alimentos de base láctea e outro alimentos ricos na vitamina B2 quando suplementados com ácido fólico visto o alto rendimento quântico de fotodegradação desta vitamina sensibilizado por flavinas. É também evidente que apenas a remoção de oxigênio da embalagem não inibe o processo deteriorativo como se imaginava já que o processo majoritário é do Tipo I, e desta maneira a adição ou utilização de produtos lácteos com teores elevados de conhecidos antioxidantes desativadores do estado triplete excitado da riboflavina, tais como o ácido úrico, seja uma alternativa na retenção das propriedades da vitamina em alimentos de base láctea fortificados.

6. Referências

- 1- 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.
- 2- 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.
- 3- 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.
- 4- 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. 341 p.
- 5- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. **Diário Oficial União**. Brasília, 18 de dezembro de 2002. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02r_dc.htm>. Acesso em: 27 de janeiro de 2010.
- 6- 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.
- 7- 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.
- 8 –LUCOCK M.; Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, p. 121–138, 2000.
- 9- 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.

- 10- CHANDLER,C.J; HARISSON,D.A; BUFFINGTON, C.A; SANTIAGO; N.A; HALSTED, C.H. Functional especificity of jejunal brush border pteroylpolyglutame hidrolase in pig. **American Journal Physiology**, v. 260, p. 865-872, 1991.
- 11- BENDER, D. A. **Introduction to nutrition and metabolism**. London: Taylor & Francis, 2002. 384 p.
- 12- MCNULTY, H.;PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 529–536, 2004.
- 13- BAILEY, L. B.; GREGORY, J.F. Folate metabolism and requeriments. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 779-782, 1999.
- 14- OWENS, J. E.; CLIFFORD, A. J.; BAMFORTH, C. W. Folate in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 3, p. 243–248, 2007.
- 15- PENNINGTON, J. A. T.; DOUGLASS, J. S. **Food values of portions commonly used**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 459 p.
- 16-MEZZOMO, C. L. S.; GARCIAS, G. de L.; SCLOWITZ, M. L.; BRUM, C.B.; FONTANA, T.; UNFRIED, R.I. Prevenção de defeitos do tubo neural:prevalência do uso da suplementação de ácido fólico e fatores associados em gestantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2716-2726, 2007.
- 17- 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.
- 18- THOMAS, A. H.; LORENTE, C.; CAPPARELLI, A. L.; POKHREL, M. R.; BRAUN, A. M.; OLIVEROS, E. Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: ph effects. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 421-426, 2002.
- 19-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.
- 20-AKHTAR, M.J.; KHAN, M. A.; AHMAD, I. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedica Analysis**, v. 19, p. 269–275, 1999.

- 21- AKHTAR, M.J.; KHAN, M. A.; AHMAD, I. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 579-588, 2003.
- 22- 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.
- 23- 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.
- 24-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.
- 25- 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.
- 26 - HUANG, R.; CHOE, E.; MIN, D. B. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 726-732, 2004.
- 27- BRADLEY, D. G.; KIM, H. J; MIN, D. B. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of waters soluble compounds in riboflavin photosensitized oxidation of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6016–6020, 2006.
- 28- FOX, P.F; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic, 1998. 496 p.
- 29- CHOE, E.; HUANG, R.; MIN, D. B. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 28-36, 2006.
- 30- PALANUK, S. L.; WARTHESEN, J. J. The kinetics of lumichrome in skim milk using nonlinear regression analysis. **Food Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 115-121, 1988.

- 31- 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.
- 32- FUH, R. A. Molar extinction of riboflavin. Disponível em: <http://omlc.orgi.edu/spectra/PhotochemCAD/abs_html/riboflavin.html>. Acesso em: 06 jan. 2010.
- 33-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.
- 34- 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.
- 35- 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.
- 36- 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.
- 37- DEROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351-371, 2002.
- 38- 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.
- 39-DOMENECH, A.; ESPAÑA-GARCIA, E.; RAMIREZ, J.A. Cyclic voltammetric analysis of pH-dependent complex formation equilibria in anion coordination chemistry. **Talanta**, v. 42, p.1663-1673, 1995.
- 40- 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.

Referências

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

42- AKHTAR, M.J.; KHAN, M. A.; AHMAD, I. Effect of riboflavin on the photolysis of folic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 1039-1044, 2000.