Regina Spricigo Scurachio

***Reatividade de lipídeos e metabólitos da
cafeína frente a estados excitados de
flavinas***

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Daniel R. Cardoso

São Carlos

2015

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

Agradecimentos

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

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

A todos os amigos, dos laboratórios de Química Inorgânica e Analítica e da Química da Aguardente (IQSC-USP), em especial Willy e Fernando pelo auxílio nos experimentos e aos demais amigos: Fernanda, Carol, Andressa, Leandro, Papa, Antônio, Vinicius, Carlos, Alexandre, Felipe, Tiago, Wendel, Daniela, Thiago, Silvia, Larissa, Marcela, Mariana, Anderson, Rafael, Ana, Evania, Augusto, Henrique, Átila, Maycon.

Aos amigos e funcionários do IQSC-USP Thiago, Silmara e Diego; aos funcionários da biblioteca; aos funcionários da caqui, ao pessoal da pós graduação, as secretárias em especial a Veroneide.

Aos amigos do Cefer: Carol, Amanda, Fernanda, Vânia, Rafael, Gabriel, Omar, Fabio e ao professor Evert.

As minhas amigas: Fernanda, Marina, Carol, Juliana, Viviana, Ariane.

Ao prof. Marcelo Gehlen e ao pessoal do laboratório de Fluorescência Molecular pela ajuda e disponibilização de infraestrutura.

A CNPq (processo 142145/2012-2) pela bolsa de estudos concedida.

Índice

Resumo

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Esquemas

Resumo

1-Introdução	19
1.1- Lipídeos.	22
1.1.1- Lipídeos Simples: Esteróides.	23
1.1.1.1-Esteróis.	24
1.1.1.1.1-Colesterol.	25
1.1.1.1.2-Ergosterol.	27
1.1.1.2-Vitamina D.	28
1.1.1.3-Coenzima Q10.	31
1.1.1.4-Vitamina K.	33
1.2. Riboflavina.	36
1.2.1. Fotopropriedades das flavinas.	37
1.3. Ácidos graxos.	40
1.3.1. Ácidos graxos e a prevenção de doenças na visão e na pele.	42
1.4. Cafeína e metabólitos.	44
1.4.1. Câncer de pele e o consumo de cafeína.	45
2-Objetivos	48
3-Procedimento Experimental	49
3.1. Reagentes utilizados.	49
3.2. Fotólise.	50
3.2.1. Preparação do sal de Parker $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$.	50
3.2.2. Cálculo da intensidade da lâmpada da bancada fotoquímica.	51
3.2.3. Determinação do rendimento quântico.	52
3.3. Espectroscopia de fluorescência molecular.	53

3.4. Laser Flash Fotólise.	53
3.5. Voltametria Cíclica.	54
3.6. LC-SPE-RMN.	54
3.7. Espectroscopia de Ressonância Nuclear.	55
3.8. Espectrometria de massas.	55
4- Resultados e Discussão	57
4.1. Reatividade do Colesterol e Ergosterol frente aos estados excitados de flavinas.	57
4.2. Reatividade da vitamina D frente aos estados excitados de flavinas.	66
4.3. Reatividade da vitamina K frente aos estados excitados de flavinas.	81
4.4. Reatividade da coenzima Q10 frente aos estados excitados de flavinas.	93
4.5. Reatividade dos ésteres ácidos graxos frente aos estados excitados de flavinas.	102
4.6. Reatividade da cafeína e seus metabólitos frente aos estados excitados de flavinas.	107
5- Conclusão	119
6- Referência Bibliográfica	121

Lista de Figuras

Figura 1. Esqueleto de um núcleo peridro ciclopentanofenantreno.	23
Figura 2. Estrutura química de um esterol.	24
Figura 3. Estrutura química do colesterol.	25
Figura 4. Estrutura química do ergosterol.	27
Figura 5. Estruturas químicas da vitamina D: (a) D ₃ - colecalciferol e (b) D ₂ – ergocalciferol.	28
Figura 6. Estrutura química da coenzima Q10.	31
Figura 7. Principais formas da vitamina K: K ₁ - Filoquinona, K ₂ - Menaquinona e K ₃ - Menaquinona.	33
Figura 8. Estruturas químicas: (a) riboflavina, (b) flavina mononucleotídeo (FMN) e (c) flavina adenina dinucleotídeo (FAD).	36
Figura 9. Espectro eletrônico de absorção da riboflavina ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹) em solução aquosa.	37
Figura 10. Formação do estado triplete excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa (440 nm). Adaptado de Huvaere, K.; Cardoso, D. R.; Homem-De-Mello, P. H.; Westermann, S.; Skibsted, L. H. Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins. J. Phys. Chem. B , v.114, p. 5583-5593, 2010.	38
Figura 11. Mecanismo de atuação de flavinas como fotossensibilizador: Tipo I e Tipo II.	39
Figura 12. Estrutura química dos ésteres metílicos de ácidos graxos investigados.	41
Figura 13. Estrutura química da cafeína, 1,7-dimetilxantina, ácido 1,7-dimetil úrico e ácido 1-metil úrico.	44
Figura 14. Espectro eletrônico de absorção de uma solução de colesterol ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹), ergosterol ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹) e de riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹), em terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25 °C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.	57
Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹) em solução aquosa.	58

4 mol.L^{-1}) em terc-butanol/água 7:3 (v/v) na presença de concentrações crescentes de: a) colesterol e b) ergosterol a 25°C . $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$.

Figura 16. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pelos esteróis a 25°C em meio de terc-butanol/água 7:3 (v/v): a) colesterol e b) ergosterol. 59

Figura 17. Decaimento de fluorescência da riboflavina na: a) ausência do supressor e na presença dos supressores: b) ergosterol e c) colesterol preparados em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25°C . 60

Figura 18. Espectro eletrônico da ΔAbs do estado triplete excitado da riboflavina (T-T) registrado $0,8 \mu\text{s}$ após o pulso de laser de com energia $\cong 10 \text{ mJ.cm}^2$ a 25°C em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v). A seta indica a região de máxima absorção da riboflavina (720 nm). 61

Figura 19. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração dos supressores, colesterol e ergosterol, preparados em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25°C , (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm^2). 61

Figura 20. Gráfico de k_{obs} versus [esterol] a 25°C : a) colesterol e b) ergosterol 62

Figura 21. Voltamogramas cíclicos dos esteróis: a)colesterol e b)ergosterol ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em ACN contendo 50 mmol.L^{-1} de LiClO_4 , utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo) a 25°C . A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s^{-1} . 63

Figura 22. Espectro eletrônico de absorção da vitamina D ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25°C . A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser. 66

Figura 23. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de concentrações crescentes da vitamina D (em terc-butanol/água 7:3 (v/v)) e registrado em diferentes temperaturas: 15°C , 25°C , 35°C e 45°C . $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$. 67

Figura 24. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina 68

pela vitamina D em diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C e 45°C.	
Figura 25. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da vitamina D em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C.	69
Figura 26. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a vitamina D em diferentes temperaturas.	70
Figura 27. Ajuste linear da equação de Van't Hoff.	72
Figura 28. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25 °C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm ²).	73
Figura 29. Gráfico de k_{obs} versus [vitamina D] a 25°C.	73
Figura 30. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm ²) para os microdomínios em micelas de Tween-20 a 25°C e uma ilustração gráfica destes microdomínios. Gráfico de k_{obs} para a reação em cada microdomínios (fase contínua, a interface micela, e núcleo hidrofóbico dos agregados micelares).	74
Figura 31. Cromatograma obtido do padrão da vitamina D (a) e do fotoproduto (b).	76
Figura 32. Espectro de massas do fotoproduto (pico 2) isolado por LC-SPE.	77
Figura 33. Espectro de ¹ H RMN do fotoproduto.	77
Figura 34. Espectro eletrônico de absorção do fotoproduto isolado da vitamina D ₃ a 25°C.	78
Figura 35. Voltamograma da vitamina D (1,0×10 ⁻³ mol.L ⁻¹) em ACN contendo 50 mmol.L ⁻¹ de LiClO ₄ , utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo) a 25°C. A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s ⁻¹ .	79
Figura 36. Espectro eletrônico de absorção da vitamina K (1,0×10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹) e riboflavina (1,0×10 ⁻³ mol.L ⁻¹) em solução de etanol/água 9:1	81

(v/v) a 25⁰C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

Figura 37. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em solução etanol/água 9:1 (v/v) na presença de concentrações crescentes de vitamina K (de ausente a $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C). $\lambda_{exc} = 440$ nm e $\lambda_{emissão} = 520$ nm. 82

Figura 38. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pela vitamina K em diferentes temperaturas. 83

Figura 39. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da vitamina K em solução etanol/água 9:1 (v/v) a 25⁰C. 85

Figura 40. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a vitamina K em diferentes temperaturas. 86

Figura 41. Ajuste linear da equação de Van't Hoff. 87

Figura 42. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25⁰C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm²). 88

Figura 43. Gráfico de k_{obs} versus [vitamina K] a 25⁰C. 89

Figura 44. Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada da vitamina K-riboflavina irradiada com luz monocromática (440 nm) por 180 minutos, operando no modo negativo por eletrospray. 91

Figura 45. Proposta para o fotoproduto gerado pela irradiação da solução vitamina K/rib, epóxido da vitamina K. 92

Figura 46. Estrutura química da menadiona. 92

Figura 47. Espectro eletrônico de absorção da CoQ10 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em solução de terc butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser. 93

Figura 48. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em solução terc butanol/água 7:3 (v/v) na presença de 94

concentrações crescentes de CoQ10 (ausente a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e em diferentes temperaturas (15, 25, 35 e 45°C). $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$.

Figura 49. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pela coenzima Q10 em diferentes temperaturas. 95

Figura 50. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da CoQ10 em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C. 96

Figura 51. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a CoQ10 em diferentes temperaturas. 97

Figura 52. Ajuste linear da equação de Van't Hoff. 98

Figura 53. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25°C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm^2). 99

Figura 54. Gráfico de k_{obs} versus [CoQ10] a 25°C. 100

Figura 55. Decaimento da banda T-T da riboflavina em função da concentração crescente dos supressores a 25°C: a) EPA e b) CLA em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v), com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm^2 . 103

Figura 56. Gráfico de k_{obs} versus [ésteres de ácidos graxos] a 25°C. 104

Figura 57. Constante de velocidade de desativação da riboflavina triplete pelos ésteres de ácidos graxos versus BDE. 105

Figura 58. Constante de velocidade de desativação da riboflavina triplete pelos ésteres dos ácidos graxos insaturados versus o número de grupos metilênicos bis-alílicos oxidáveis na molécula. 106

Figura 59. Espectro eletrônico de absorção da cafeína e seus metabólitos ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução tampão fosfato pH= 6,4 a 25°C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser. 107

Figura 60. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato pH= 6,4 na presença de concentrações crescentes dos metabólitos da cafeína (de zero a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) a 108

25⁰C. $\lambda_{exc} = 440\text{nm}$ e $\lambda_{emissão} = 520\text{nm}$.

Figura 61. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pelos metabólitos da cafeína a 25⁰C. 109

Figura 62. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência de cada metabólito da cafeína em tampão fosfato pH=6,4 a 25⁰C. 111

Figura 63. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e os metabólitos da cafeína, e razão estequiométrica do número de ligantes (n) por sítio de ligação para as diferentes temperaturas. 113

Figura 64. Ajuste linear da equação de Van't Hoff. 114

Figura 65. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração dos metabólitos da cafeína, preparados em tampão fosfato pH=6,4 a 25⁰C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm²). 115

Figura 66. Gráfico de k_{obs} versus [metabólitos da cafeína] a 25⁰C. 116

Figura 67. Voltamogramas cíclicos dos metabólitos da cafeína a 25⁰C: (A) cafeína (B) ácido 1-metil urico (C) ácido 1,7-dimetil urico (D) 1,7 dimetilxantina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato pH=6,4 contendo 50 mmol.L⁻¹ de hexafluorofosfato de tetra-n-butilamônio, utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s⁻¹. 117

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais fontes alimentares de vitamina D.	30
Tabela 2. Principais fontes alimentares de coenzima Q10.	32
Tabela 3. Reagentes e solventes utilizados.	49
Tabela 4. Valores de ΔG° para a reação entre esteróis com os estados singlete e triplete da riboflavina.	64
Tabela 5. Rendimento quântico de degradação dos esteróis sensibilizados pela riboflavina na ausência e presença de O_2 .	65
Tabela 6. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela vitamina D em diferentes temperaturas.	68
Tabela 7. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a vitamina D, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para diferentes temperaturas.	71
Tabela 8. Rendimento quântico de degradação da vit D sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O_2 .	75
Tabela 9. Deslocamentos químicos de 1H -RMN obtido do espectro do fotoproduto e da literatura.	78
Tabela 10. Valores de ΔG° para a reação entre vitamina D com os estados singlete e triplete da riboflavina.	79
Tabela 11. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela vitamina K em diferentes temperaturas.	84
Tabela 12. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a vitamina K, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para as diferentes temperaturas.	87
Tabela 13. Rendimento quântico de degradação da vit K sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O_2 .	90
Tabela 14. Valores de ΔG° para a reação entre vitamina K com os estados singlete e triplete da riboflavina.	90
Tabela 15. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela coenzima Q10 em diferentes	95

temperaturas.

Tabela 16. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a CoQ10, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para as diferentes temperaturas.	98
Tabela 17. Rendimento quântico de degradação da CoQ10 sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O_2 .	101
Tabela 18. Valores de ΔG° para a reação entre CoQ10 com os estados singlete e triplete da riboflavina.	101
Tabela 19. Valores das constantes de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina 3k_q . Valores da energia de dissociação da ligação (BDE) C-H para os ésteres de ácidos graxos e o número de hidrogênios bis-aliílicos.	104
Tabela 20. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina para cada metabólito da cafeína.	110
Tabela 21. Tempo de vida calculado por fluorescência resolvida no tempo para a riboflavina e metabólitos da cafeína.	111
Tabela 22. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e os metabólitos da cafeína, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para as diferentes temperaturas.	113
Tabela 23. Valores de ΔH^0 e ΔS^0 para cada metabólito da cafeína calculados pela equação de Van't Hoff.	114
Tabela 24. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina para cada metabólitos da cafeína.	116
Tabela 25. Potenciais de oxidação da cafeína e seus metabólitos.	118
Tabela 26. Valores de ΔG° para a reação entre cafeína e seus metabólitos com os estados singlete e triplete da riboflavina.	118

Lista de Esquemas

Esquema 1. Formação da vitamina D ₃ a partir da 7-deidrocolesterol.	29
Esquema 2. Mecanismo proposto para a isomerização da 5,6- <i>trans</i> -vitD ₃ através do mecanismo de transferência de energia de Dexter.	80

Lista de abreviaturas e siglas

Vit. D = vitamina D

Vit. K = vitamina K

CoQ10 = coenzima Q10

ANVISA = agência nacional de vigilância sanitária

FMN = flavina mononucleotídeo

FAD = flavina adenosina dinucleotídeo

Rib = riboflavina

ET = transferência de elétrons

HAT = transferência de átomo de hidrogênio

SPLET = perda de próton seguida por transferência de elétrons

PCET = transferência de elétrons acoplada a prótons

NHE = eletrodo normal de hidrogênio

Ag/AgCl = prata/ cloreto de prata

DMRI = degeneração macular relacionada a idade

EPA = ácido eicosapentaenóico

DHA = ácido docosaheptaenóico

ARA = araquidonato de metila

CLA = ácido linoleico conjugado

LC-SPE-RMN = Extração em Fase Sólida como interface entre a cromatografia líquida e a RMN

RMN = ressonância magnética nuclear

ACN = acetonitrila

MeOH = metanol

NOESY = Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

BDE = energia de dissociação

Nd:YAG = laser de Neodímio YAG (ítrio-alumínio-granada)

Resumo

A presente tese descreve o estudo cinético e mecanístico da desativação do estado singlete- e triplete-excitado de flavinas por esteróis (colesterol e ergosterol), vitamina D, coenzima Q10, vitamina K, ácidos graxos e metabólitos da cafeína. Através da análise de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da riboflavina pelo colesterol, ergosterol, vitamina D, vitamina K, e pela coenzima Q10 observa-se que o estado singlete excitado da riboflavina é desativado com constante de velocidade superior ao limite da difusão. No entanto, a presença de colesterol, ergosterol, vitamina D, vitamina K e coenzima Q10 não afeta o tempo de vida do estado singlete excitado da riboflavina como demonstrado por experimentos de contagem de fótons resolvido no tempo sugerindo a formação de um complexo precursor [riboflavina...substrato]. O complexo 1:1 formado entre a riboflavina e a vitamina D apresenta $K_a = 4 \times 10^4 \pm 3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a 25 °C com $\Delta H^\circ = -36 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = -5 \pm 3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. O complexo 1:1 entre a riboflavina e a vitamina K (vit K) e a riboflavina com a coenzima Q10 (CoQ10) apresentam $K_a = 1 \times 10^3 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\Delta H^\circ = -110 \pm 22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 51 \pm 9 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para a vit K e $K_a = 4 \times 10^2 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\Delta H^\circ = -120 \pm 27 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 41 \pm 7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para a CoQ10 a 25 °C. Para a desativação do estado triplete da riboflavina, foram obtidas constantes bimoleculares de velocidade variando de $1,4 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (vit D) a $1,4 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (CoQ10). Observa-se supressão da emissão de fluorescência da riboflavina na presença de metabólitos da cafeína, no entanto, sem alterar o tempo de vida do estado singlete excitado da riboflavina sugerindo a formação de um complexo precursor [riboflavina...substrato]. O complexo formado entre a riboflavina e os metabólitos da cafeína apresentam $K_a = 295 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\Delta H^\circ = -45 \pm 8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 12 \pm 1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para o ácido 1,7-dimetil úrico, $K_a = 289 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\Delta H^\circ = -38 \pm 5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 9 \pm 2 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para o ácido 1-metil úrico e $K_a = 275 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com $\Delta H^\circ = 16 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 6 \pm 1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ para a 1,7-dimetilxantina a 25 °C. Para a desativação do estado triplete da riboflavina, foram obtidas constantes de velocidade de $^3k_q = 4,2 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para a 1,7-dimetilxantina, $^3k_q = 1,0 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o ácido 1,7-dimetil úrico e $^3k_q = 1,4 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o ácido 1-metil úrico. Os ésteres metílicos (oleato de metila, ácido linoléico conjugado (CLA), linoleato de metila, linolenato de metila, araquidonato de metila, eicosapentanoato de metila, e docosahexanoato de metila) não desativam o estado singlete-excitado da riboflavina. Entretanto, os ésteres metílicos se mostraram reativos frente ao estado triplete da riboflavina com constantes de velocidades 3k_q variando de $8,4 \times 10^5$ a $3,3 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ com uma dependência linear do número de hidrogênios bis-alílicos com excessão do CLA.

Abstract

The present thesis describes the kinetic and mechanistic studies of flavin singlet- and triplet-excited states deactivation by sterols (ergosterol and cholesterol), vitamin D, coenzyme Q10, vitamin K, fatty acids, and caffeine metabolites. From the Stern-Volmer analysis of the riboflavin fluorescence quenching by cholesterol, ergosterol, vitamin D, vitamin K and coenzyme Q10, it is noted that the singlet-excited state of riboflavin is deactivated with a rate constant exceeding the diffusion limit. However, the presence of cholesterol, ergosterol, vitamin D, vitamin K, coenzyme Q10 did not affect the lifetime of singlet-excited riboflavin as probed by single photon counting experiments suggesting the formation of a ground-state precursor complex [riboflavin ...substrate]. The 1:1 complex formed between riboflavin and vitamin D showed $K_a = 4 \times 10^4 \pm 3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ at 25 °C with $\Delta H^\circ = -36 \pm 7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = -5 \pm 3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. The 1:1 complex formed between riboflavin and vitamin K (vit K) and riboflavin with coenzyme Q10 (CoQ10) showed $K_a = 1 \times 10^3 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with $\Delta H^\circ = -110 \pm 22 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = 51 \pm 9 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ for vit K e $K_a = 4 \times 10^2 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\Delta H^\circ = -120 \pm 27 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = 41 \pm 7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ for CoQ10 at 25 °C. For the deactivation of triplet riboflavin, bimolecular rate constants were found to vary from $1.4 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (vit D) to $1.4 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (CoQ10). The caffeine metabolites quench fluorescence emission of riboflavin however, without affecting the lifetime of the singlet-excited state, suggesting the formation of a ground state precursor complex [riboflavin ... substrate]. The complex formed between riboflavin and caffeine metabolites showed $K_a = 295 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with $\Delta H^\circ = -45 \pm 8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = 12 \pm 1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ for 1,7-dimethyl uric acid, $K_a = 289 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with $\Delta H^\circ = -38 \pm 5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = 9 \pm 2 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ for 1- methyl uric acid, and $K_a = 275 \pm 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ with $\Delta H^\circ = 16 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\circ = 6 \pm 1 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ for 1,7-dimethylxanthine at 25 °C. For the deactivation of triplet riboflavin, rate constant were obtained with $^3k_q = 4.2 \times 10^8 \pm 0.3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for 1,7-dimethylxanthine, $^3k_q = 1.0 \times 10^8 \pm 0.5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for 1,7-dimethyl uric acid, and $^3k_q = 1.4 \times 10^8 \pm 0.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for 1-methyl uric acid. The methyl esters (methyl oleate, conjugated linoleic acid (CLA), methyl linoleate, methyl linoleate, methyl arachidonate, methyl eicosapentanoate, and methyl docosahexanoate) did not quench the singlet-excited riboflavin. However, the methyl esters were shown to be reactive towards triplet riboflavin with rate constants ranging from $^3k_q 8.4 \times 10^5$ to $3.3 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and depending linearly with the number of bis-allylic hydrogens with exception to CLA.

1.Introdução

O atual aumento na competitividade nas diferentes cadeias agroindustriais, tanto no mercado nacional quanto internacional, tem forçado a indústria de alimentos a desenvolver produtos de melhor qualidade quanto à segurança alimentar, a rastreabilidade, e a qualidade sensorial e nutricional dos produtos.

Alimentos processados e industrializados em geral apresentam a necessidade de enriquecimento ou fortificação com micronutrientes, vitaminas em função do impacto negativo de alterações físico-químicas e químicas na estabilidade das vitaminas durante seu processamento e estocagem.

Dentre os diversos fatores responsáveis pela instabilidade dos alimentos, a exposição à radiação luminosa é determinante principalmente em alimentos ricos em riboflavina (um dos principais fotosensibilizadores biológicos capaz de causar danos), como por exemplo, leite e derivados. Outro fator que deve ser levado em consideração para estes alimentos é a utilização de embalagens transparentes, pois estas facilitam as reações de fotooxidação em vários produtos alimentícios como leite e derivados, cervejas, vinhos, carnes que são em geral sensíveis à radiação luminosa e essas reações foto-iniciadas afetam não somente a qualidade sensorial, mas também levam a formação de substâncias tóxicas e carcinogênicas e a degradação de importantes nutrientes.

Os fatores gerais que afetam negativamente a estabilidade dos alimentos expostos a radiação luminosa são: a intensidade da luz, o intervalo de exposição, tipo de embalagem, e alguns componentes nutritivos específicos.

A riboflavina, além de atuar como fotosensibilizador em alimentos como citado anteriormente, também atua em tecidos humanos, resultando em fotodegradação e danos aos tecidos quando exposta a luz. O teor de riboflavina na pele humana ($7,9 \times 10^6$) e no fluido do olho ($4,5 \times 10^6$) é relevante para as funções de riboflavina como um fotosensibilizador na pele e olhos (1).

A fotoproteção da pele e os olhos pode ser feita por alimentos que contenham, por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados que podem ser encontrado em peixes e também a cafeína, encontrada em café e chocolate, além do uso de filtros solares (2,3).

Nos últimos anos tem crescido o número de trabalhos que mostram os benefícios nutricionais a saúde, pele e olhos da população ao aumentar o conteúdo dos ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados e fitoesteróis na dieta e de trabalhos que mostram a importância do consumo de vitamina D para a absorção de cálcio no intestino atuando na mineralização dos ossos (3,4).

Os ácidos graxos estão sendo reconhecidos como macronutrientes fotoprotetores na pele e nos olhos que protegem contra os efeitos nocivos da luz solar, inibe a inflamação da pele, o fotoenvelhecimento, a fotocarcinogênese, e reduzem a incidência de degeneração macular (3,5). Alguns esteróis de origem vegetal parecem apresentar efeitos benéficos semelhantes (6).

A preservação e valor nutritivo dos alimentos ricos em lipídeos poliinsaturados são comprometidos pela instabilidade oxidativa, que leva à formação de produtos potencialmente tóxicos. A etapa de iniciação da cadeia de radicais de peroxidação de lipídeos depende da atividade enzimática, catálise por metais de transição, ou a exposição à irradiação luminosa e a presença de fotosensibilizadores (7).

Sabendo dos benefícios que os lipídeos podem trazer a saúde é possível utilizá-los na formulação de produtos lácteos enriquecidos com óleo de peixe ou esteróis vegetais assim como já ocorre com a vitamina D onde seus precursores são utilizados pra enriquecimento de produtos lácteos a fim de suprir a necessidade diária desta vitamina. Os produtos lácteos são conhecidos por serem ricos em riboflavina e o enriquecimento de produtos lácteos com lipídeos de peixe pode causar a deterioração fotooxidativa rápida desses alimentos funcionais, assim como pode também causar deterioração no caso de produtos enriquecidos com vitamina D.

Estudos mostram também a importância da cafeína para a prevenção do câncer de pele e catarata. Pessoas que tiveram maior ingestão de cafeína apresentaram um risco menor de câncer de pele quando comparado a pessoas com o menor consumo de cafeína (8,9). O estudo mostra que a cafeína previne o surgimento de catarata. Acredita-se que este efeito protetor seja devido ao efeito antioxidante da cafeína, protegendo o cristalino contra os efeitos dos radicais gerados pela exposição a radiação UV-A e UV-B (10).

Assim, em decorrência da ausência dados cinéticos para a reação entre o estado triplete de flavinas com lipídeos (colesterol, ergosterol, vitamina D, vit K, coQ10 e ésteres de ácidos graxos) e com a cafeína e seus metabólitos, a presente tese visa avaliar a estabilidade, reatividade e mecanismo de reação de alguns lipídeos e metabólitos da cafeína frente aos estados excitados das flavinas.

1.1. Lipídeos

Lipídeos por definição são substâncias de origem biológica, solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (11). Os lipídeos possuem várias funções biológicas importantes, servindo como componentes estruturais de membranas, como formas de armazenamento e transporte de combustível metabólico, como uma película protetora sobre a superfície de muitos organismos e como componentes de superfície celular incumbidos de reconhecimento de células, da especificidade de espécies e da imunidade dos tecidos. Algumas substâncias classificadas entre os lipídeos possuem intensa atividade biológica; elas incluem algumas das vitaminas (como por exemplo, a vitamina K) e hormônios (como por exemplo, a vitamina D) (11,12).

Embora os lipídeos sejam uma classe distinta de biomoléculas eles ocorrem geralmente combinados, seja covalentemente ou através de ligações fracas, como membros de outras classes de biomoléculas, para produzir moléculas híbridas como glicolipídeos que contêm tanto carboidratos quanto lipídeos e lipoproteínas que contêm tanto proteínas quanto lipídeos (11,12).

A classificação dos lipídeos baseia-se nas estruturas de seus esqueleto hidrocarbônico:(11,12).

- 1) **Lipídeos complexos:** contêm caracteristicamente ácidos graxos como componentes, incluem os acilgliceróis, os fosfoglicerídeos, os esfingolipídeos e as ceras, que diferem na estrutura dos esqueletos aos quais os ácidos graxos estão covalentemente ligados. Eles são também denominados lipídeos saponificáveis, uma vez que produzem sabão sob-hidrólise alcalina.
- 2) **Lipídeos simples:** não contêm ácidos graxos e, portanto não são saponificáveis. Incluem os terpenos, os esteróides e prostaglandinas.

1.1.1. Lipídeos Simples: Esteróides

Esteróides são derivados do hidrocarboneto tetracíclico saturado peridro-ciclopentanofenantreno, Figura 1. Uma grande quantidade de esteróides diferentes cada um deles com uma função ou atividade distinta tem sido isolada de fontes naturais. Os esteróides diferem em número e posição das duplas ligações, no tipo, localização, e no número de grupos funcionais substituintes na configuração (α e β) das ligações entre os grupos substituintes e o núcleo e na configuração dos anéis em uma relação ao outro, uma vez que o hidrocarboneto de origem possui seis centros assimétricos. Todos os esteróides originam-se do triterpeno linear esqualeno o qual cicliza facilmente (11).

Figura 1. Esqueleto de um núcleo peridro-ciclopentanofenantreno.

O primeiro esteróide importante é o lanosterol que em tecido animal é precursor do colesterol que em animais é o esteróide mais abundante. O lanosterol e o colesterol são membros de um grande subgrupo de esteróides que são os esteróis (12).

1.1.1.1. Esteróis

Esteróis são álcoois esteróides contendo um grupo hidroxílico no carbono 3 do anel A e uma cadeia alifática ramificada no carbono 17. Eles sempre apresentam três anéis de seis carbonos e um anel de cinco carbonos ligados à cadeia alifática. Os anéis são designados por A, B, C e D (Figura 2). Os esteróis mais frequentes, tais como o colesterol (encontrado em praticamente todos os organismos eucariotes), β -sitosterol e estigmasterol (encontrados em óleos vegetais) e ergosterol (encontrado em leveduras e outras fontes microbiológicas), diferem entre si principalmente quanto à natureza da cadeia lateral ligada ao C-17 (11,12).

Figura 2. Estrutura química de um esterol.

Os esteróis atuam como precursor de esteróides assim como o ergosterol é uma pré-vitamina para a vitamina D₂ e o 7-deidrocolesterol para a vitamina D₃ (11,12).

Eles são encontrados tanto em plantas (fitosteróis) quanto em animais (zooesteróis). O colesterol é o principal esterol encontrado nos lipídeos de origem animal e ele pode ser encontrado em plantas como um esterol minoritário (13,14,15).

São considerados componentes essenciais às membranas das células, e podem ser produzidos por animais e plantas. Eles têm papel essencial na regulação da fluidez da membrana e na permeabilidade. O colesterol em animais e o ergosterol em fungos cumprem este papel. (13).

Mais de 200 esteróis foram encontrados em plantas e se destacam: sitosterol, campesterol e estigmasterol (15).

1.1.1.1.1. Colesterol

O Colesterol é o mais importante e o mais abundante dos esteróis, lipídeos cíclicos de grandes dimensões. Sua estrutura química, Figura 3, é formada por núcleos policíclicos com quatro anéis condensados que formam estrutura complexa chamada ciclopentanofenantreno e uma cadeia alifática ramificada a partir do carbono C-17(16,17). Apresenta uma dupla ligação entre os carbonos C5 e C6 do anel B sendo susceptível a oxidação (17) originando uma serie de produtos oxidados com estruturas semelhantes, os óxidos do colesterol (16,17).

Figura 3. Estrutura química do colesterol.

O colesterol também apresenta uma função estrutural, como componente de todas as membranas celulares animais e humanas, conferindo certo grau de fluidez às mesmas. Também participa do metabolismo de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) sendo o principal precursor da vitamina D₃ e de hormônios esteróides como os hormônios sexuais masculinos e femininos (testosterona, progesterona e estradiol) e outros hormônios, como o cortisol e a aldosterona. Possui papel importante na síntese de sais biliares (ácido cólico e desoxicólico), os quais atuam como agentes emulsificantes na digestão das gorduras (16,18).

Encontrado somente nas gorduras de origem animal, quase totalmente na sua forma livre (e não na forma esterificada) (19). A maior parte do colesterol do organismo humano, aproximadamente 70%, é proveniente da síntese biológica (colesterol endógeno), sendo que apenas 30% é fornecido pela dieta (colesterol exógeno) (20). É mais abundante nos tecidos que mais

sintetizam ou que possuam membranas densamente agrupadas como cérebro, fígado e medula espinhal (18).

A oxidação do colesterol está relacionada com o desenvolvimento de arterosclerose e ao enrijecimento das artérias que podem levar ao aparecimento de doenças mais sérias como infarto ou derrame. Além disso, foi comprovado que cálculos biliares de populações ocidentais são compostos predominantemente por colesterol (21). O consumo excessivo de alimentos considerados ricos em colesterol ou contendo ácidos graxos precursores de colesterol provoca um desequilíbrio na sua produção resultando no aumento de sua concentração na corrente sanguínea. Este fato contribui para a deposição de colesterol nas artérias, a formação de plaquetas e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (20,21).

Pode ser ingeridos através do consumo de leite e derivados, carnes, aves, peixes, frutos do mar, ovos ou produtos industrializados contendo algum destes ingredientes. Alguns alimentos contêm colesterol em maiores quantidades, como o fígado (um bife de 100 g possui entre 240 e 350 mg de colesterol dependendo do animal) e a gema de ovo (270 mg uma unidade, em média). Recomenda-se que a ingestão diária de colesterol para indivíduos saudáveis fique entre 250 a 300 mg (16,20).

A presença do colesterol em alimentos está no fato comprovado de que o colesterol pode sofrer oxidação, formando óxido de colesterol. Estes óxidos são considerados agentes aterogênicos, carcinogênicos e mutagênicos (22). A oxidação do colesterol pode ocorrer por reações enzimáticas ou por reações não enzimáticas. As enzimáticas ocorrem no organismo e as reações não enzimáticas em alimentos, pelos processos de autooxidação, peroxidação lipídica ou oxidação fotoinduzida (21).

1.1.1.1.2. Ergosterol

Ergosterol (Figura 4) é o maior esterol e principal componente presente nas membranas de eucariontes inferiores como fungos (leveduras, cogumelos e bolores) e exerce funções semelhantes às do colesterol em células animais (ergosterol é ausente em membranas celulares de animais) (12,23).

Figura 4. Estrutura química do ergosterol.

Está presente em duas principais formas, livres e esterificadas, e a quantidade dependerá da espécie do fungo. Ergosterol sofre fotólise quando exposto aos raios UV-B (280-320nm) formando a pré-vitamina D₂ que se transforma em vitamina D₂ através de rearranjo térmico (12,23). Ergosterol também tem se mostrado propriedades que ajudam na saúde como atividades anti-inflamatórias e anti-hiperlipidêmico e antioxidante (23).

Ergosterol encontra-se envolvido em várias funções biológicas tais como fluidez da membrana, regulação, atividade e distribuição integral de proteínas da membrana e controle do ciclo celular (24). Também está envolvido na atividade de expressão de genes de defesa e parece aumentar a resistência das plantas contra os agentes patogênicos (23). A ausência do ergosterol afeta a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes tornando o organismo suscetível (24,25).

Como a sua principal função está relacionada a manutenção das membranas celulares e crescimento dos fungos, ele tem sido alvo principal para produção de drogas antifúngicas para o tratamento de infecções fúngicas graves em humanos (24).

Ergosterol está associado a citoplasma de fungos no solo. Ele não é produzido por todos os fungos e a sua concentração varia entre a mesma

espécie dependendo do estado fisiológico dos fungos. Ele tem sido utilizado amplamente para quantificar a biomassa em vários estudos de solos e sistemas micorrízicos e para determinação da biomassa associada a decomposição folhas em águas doces (25).

1.1.1.2. Vitamina D

A vitamina D, um hormônio esteroide lipossolúvel (Figura 5), é considerada um nutriente essencial, que pode ser obtido através de via endógena (por exposição solar) e obtenção exógena (dieta e alimentos fortificados). Por sua estrutura química ser semelhante aos hormônios esteroides, ele é considerado um hormônio (26).

Figura 5. Estruturas químicas da vitamina D: (a) D₃ - colecalciferol e (b) D₂ - ergocalciferol.

Ela é encontrada sob duas formas: como ergocalciferol (vitamina D₂) produzida pelas plantas e como colecalciferol (vitamina D₃) produzida no tecido animal pela ação da luz na região do UV-B (290 a 310 nm) na pele humana (10). Somente os raios UV-B, capazes de penetrar na pele, levam o 7-deidrocolesterol (presente na pele) a sofrer uma clivagem fotoquímica originando a pré-vitamina D₃. Essa molécula em um período de 48 horas, a temperatura de 37°C, sofre um rearranjo molecular o que resulta na formação da vitamina D₃, como visto no esquema 1 (27,28).

Quando ingerida, a vitamina D₃ é absorvida no intestino delgado, incorporada a quilomícrons e levada por estes ao fígado. A partir deste

momento, o metabolismo é igual ao da vitamina D₃ sintetizada pela pele. Estima-se que 90 a 95% da vitamina D corpórea seja adquirida pela síntese cutânea e o restante pela ingestão e absorção de alimentos (26).

Esquema1. Formação da vitamina D₃ a partir da 7-deidrocolesterol.

A insuficiência desta vitamina está relacionada a diversos fatores como: idade, pigmentação da pele, tempo de exposição solar e ingestão alimentar. Apesar da vitamina D ser produzida por exposição da pele pelos raios solares, seu consumo dietético se torna essencial quando a exposição solar é insuficiente para alcançar as necessidades diárias. Isso tem se tornado comum em pessoas residentes em centros urbanos que estão expostos a menores níveis de raios solares (29).

Os principais alimentos fontes de vitamina D (Tabela 1) são a gema de ovo, fígado, manteiga e leite. Em geral, carnes e peixes magros têm traços desta vitamina, estando as maiores concentrações no arenque e na cavala (29). Óleos de fígado de peixes como atum e linguado, bacalhau em particular e peixes como salmão, cavala, enguia, sardinha, arenque e atum são ricos em vitamina D (28,29).

Tabela 1. Principais fontes alimentares de vitamina D (28,29).

Alimento	µg/100g
Óleo de peixe	40
Atum	4
Sardinha crua	5
Sardinha enlatada	17
Manteiga	0,5
Fígado de boi	1
Fígado de frango	1
Gema fresca	0,5
Ovo	0,9
Leite integral	0,2
Cogumelos	0,6

A principal função da vitamina D consiste no aumento da absorção intestinal de cálcio, participando da estimulação do transporte ativo desse íon nos enterócitos (27,30). A deficiência prolongada de vitamina D provoca raquitismo e osteomalacia e, em adultos, quando associada à osteoporose, leva a um risco aumentado de fraturas (27).

Estudos epidemiológicos mostram que a deficiência de vitamina D poderia estar associada a risco aumentado de neoplasia de cólon e próstata, doença cardiovascular e infecções. Estudos atuais têm relacionado à deficiência de vitamina D com várias doenças autoimunes, incluindo diabetes melito insulino-dependente (DMID), esclerose múltipla (EM), doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR). Diante dessas associações, sugere-se que a vitamina D seja um fator extrínseco capaz de afetar a prevalência de doenças autoimunes (4,27).

A dose diária recomendada de vitamina D é uma ingestão de 2,5 -10 µg/dia, sendo as maiores doses para crianças, mulheres grávidas e que estão amamentando e para idosos acima de 71 anos (31).

1.1.1.3. Coenzima Q10

Coenzima Q10 (CoQ10), também conhecida como ubiquinona, Figura 6, é um lipídeo encontrado na maioria dos organismos aeróbicos. Ela pode ser obtida por duas vias: por via exógena pela ingestão de alimentos e por via endógena (32).

Figura 6. Estrutura química da coenzima Q10.

Ela se encontra em todas as células do corpo humano e as maiores concentrações são observadas nos tecidos do cérebro, fígado, coração e músculo esquelético (32,33,34). Sabe-se que maioria da coenzima Q10 produzida pelo corpo é produzida no fígado, mas ela pode ser também obtida pela dieta alimentar. A contribuição média pela ingestão alimentar é de 2 a 5 mg de CoQ10 por dia e este valor nunca é suficiente para suprir as necessidades do organismo isso porque apenas 10% é absorvida pelo trato intestinal devido a sua baixa solubilidade em água e elevado peso molecular (34,35). As principais fontes alimentares da CoQ10 encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Principais fontes alimentares de CoQ10 (34,35).

Alimento	µg/ 100g de peso úmido
carne bovina	3100
Frango	1400
Peixe	1300-180
Brócolis	701
Ovos	150
Cereais	490-60
Leite	31

A concentração da coenzima Q10 na epiderme é de $4,1 \pm 0,6$ nmol/g de pele e na derme é $2,9 \pm 0,8$ nmol/g de pele (36). No olho o conteúdo da coQ10 é de $0,426 \pm 0,067$ µg/g de lente úmida (37). Sua maior concentração no corpo humano ocorre na membrana mitocondrial, sendo um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons durante o processo de respiração e fosforilação oxidativa que envolve a produção de trifosfato de adenosina (ATP) (32,33).

Além de sua ocorrência natural, a CoQ10 é comercializada como suplemento alimentar ou nutracêutico em vários países, e utilizada em formulação cosmética (38,39).

A CoQ10 possui a capacidade de proteger fosfolipídeos, proteínas da membrana mitocondrial e o DNA dos danos oxidativos além de manter os níveis de antioxidantes, como o ácido ascórbico e α -tocoferol, dentro das células (34,35,40,41).

A produção de CoQ10 diminui com a idade, o que aumenta a necessidade de sua suplementação, já que a falta de CoQ10 pode causar danos no cérebro, em outros órgãos e nas mitocôndrias (32,34).

Além de ajudar na prevenção de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson pode ser utilizada no tratamento de doenças cardíacas como: arteriosclerose, isquemia, insuficiência cardíaca crônica, hipertensão, arritmia; no tratamento de câncer de mama, de infertilidade masculina e pré-eclâmpsia, e crises de enxaqueca; ajuda no controle do diabetes e aumenta a resposta ao esforço físico. Pesquisas sobre CoQ10 mostram que no sangue dos cardiopatas há 25% menos CoQ10 do que nos indivíduos saudáveis (32,34,35,38,42).

A dose diária recomendada, dependendo da idade do ser humano, pode variar de 50 a 200 mg/dia (43).

1.1.1.4. Vitamina K

A vitamina K, Figura 7, é uma vitamina lipossolúvel. Suas formas principais são: vitamina K₁ (Filoquinona) que é a forma predominante presente nos vegetais, vitamina K₂ (Menaquinona), que são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias do trato intestinal de um grande número de espécies e vitamina K₃ (Menadiona) que é um composto sintético convertido microbiologicamente em K₂ no intestino (44,45,46).

Figura 7. Principais formas da vitamina K: K₁- Filoquinona, K₂- Menaquinona e K₃- Menadiona.

A quantidade de vitamina K₁ presente nos alimentos é influenciada por diversos fatores como a fertilização e condições do solo, clima, área geográfica, estado de maturação e variação sazonal, sendo verificado que os meses de verão aumentam mais a quantidade da filoquinona que os meses de inverno (44,47). As várias formas de vitamina K são relativamente estáveis ao calor e são mantidas após a maioria dos processos de cozimento. Esta vitamina é decomposta pela luz solar, mas somente a vitamina K₁ é decomposta pelo oxigênio molecular (48).

A baixa taxa de absorção da vitamina K pode ser devida a fatores relacionados com a digestão da mesma e com o fato desta vitamina, presente em grandes quantidades em vegetais verde-escuros, se apresentar intimamente ligada à membrana dos tilacóides no cloroplasto, mesmo após o

processo de cozimento dos vegetais, o que dificulta sua absorção (49). No entanto, em alimentos processados como óleo, margarina e produtos lácteos a absorção desta vitamina é mais eficiente (50).

Os principais alimentos ricos em vitamina K são os vegetais de folha escura, como brócolis, couve-flor, agrião, rúcula, repolho, espinafre, nabo, alface (48,49,50).

A principal função da vitamina K é promover a síntese dos fatores de coagulação sanguínea, atuando como co-fator para a carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico para formar o ácido gama carboxiglutâmico (Gla), aminoácido presente nos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X) e que se apresenta ligado ao cálcio (45,51).

Existem ainda diversos outros grupos de proteínas dependentes da vitamina K que estão ligados à homeostasia de cálcio, como a osteocalcina, uma das mais frequentes proteínas não-colagenosas na matriz extracelular do osso. Pesquisas têm apontado a vitamina K como um importante fator no processo de mineralização óssea, sendo essencial tanto no desenvolvimento precoce do esqueleto, quanto na manutenção do osso maduro sadio (45,52). A principal deficiência da vitamina K é a hemorragia, que em casos graves pode levar a anemia fatal, sendo as principais causas: inadequação alimentar, doença hemorrágica do recém-nascido, nutrição parenteral total, síndrome de má absorção, doença hepática e terapia medicamentosa (46,52).

Em adultos saudáveis a deficiência primária pode ser considerada rara; no entanto, pode ocorrer a deficiência em indivíduos que apresentam baixa ingestão da vitamina associada ao uso de determinados medicamentos e em pacientes debilitados tratados ou não com antibióticos após uma cirurgia (32,52). Outros fatores como a ingestão excessiva de determinadas vitaminas (elevadas doses de vitaminas A e E) podem também contribuir para a deficiência de vitamina K, já que estes atuam antagonizando a ação desta vitamina (45,49,52).

A doença hemorrágica do recém-nascido (HDN) é uma das principais causas de mortalidade infantil e se caracteriza por tendência a hemorragia intracraniana, na pele, gastrointestinal e nasal, normalmente se manifesta entre 1 a 7 dias após o parto. Diversos fatores contribuem para esta deficiência, entre eles estão: baixo transporte de lipídeos pela placenta; limitada reserva de

vitamina K; esterilidade do intestino infantil durante os primeiros dias de vida; baixo conteúdo de vitamina K em leite materno (49,52). Já em crianças entre um a três meses pode haver o aparecimento da doença hemorrágica tardia (LHD), a qual apresenta as mesmas manifestações clínicas que a HDN e está relacionada à má absorção ou doença hepática (53).

A ingestão diária recomendada (IDR) segundo a ANVISA é de 65 µg vit. Kg/dia para adultos; 55 µg vit. Kg/dia para gestantes e lactantes; 15 a 25 µg vit. Kg/dia para crianças (54).

1.2. Riboflavina

A riboflavina, (Figura 8) também conhecida como vitamina B₂, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B (55,56,57,58). Os produtos lácteos são considerados a maior fonte de vitamina B₂, juntamente com ovos e fígado (55,56,57,58). O leite in natura contém aproximadamente 1,75 mg de riboflavina por um litro (59). Majoritariamente, entre 65-95%, da riboflavina no leite está presente na forma livre e a fração restante como e seus derivados biologicamente ativos FMN (flavina mononucleotídeo) e FAD (flavina adenosina dinucleotídeo) (60).

Figura 8. Estruturas químicas: (a) riboflavina, (b) flavina mononucleotídeo (FMN) e (c) flavina adenina dinucleotídeo (FAD).

A riboflavina é necessária na síntese do FAD e do FMN e ambas são provenientes da dieta e estão comumente ligadas às proteínas, na forma de coenzimas, auxiliando um grande número de enzimas que catalisam diferentes processos de oxirredução durante o processo metabólico de carboidratos, lipídeos e proteínas (60). Além disso, a vitamina B₂ é importante para a saúde dos olhos, pele, boca e cabelos (55,56,57,58). Também é necessária para a formação de células vermelhas do sangue, respiração, produção de anticorpos, regulação do crescimento e da reprodução humana (58).

A deficiência de riboflavina provoca rachaduras nos cantos da boca e nariz, estomatite, coceira e ardor nos olhos, inflamações das gengivas com sangramento, língua arroxeadas, pele seca, depressão, catarata, letargia e histeria (55, 56,57).

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. 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.

1.2.1. Fotopropriedades das flavinas

O cromóforo anel tricíclico de isoaloxazina, comum a todas as flavinas, possui duas bandas características de absorção na região do visível com máximo de absorção em 375 e 446 nm, Figura 9. Os correspondentes valores de absorvidade molar ($\epsilon_{375\text{nm}} = 9.155 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{446\text{nm}} = 10.645 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (61), consideravelmente altos, são um indicativo de transições $\pi - \pi^*$ resultando em estados singlete excitados ($^1\text{Rib}^*$).

Figura 9. Espectro eletrônico de absorção da riboflavina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução aquosa.

Cálculos *ab initio* empregando a teoria da densidade funcional (DFT) revelam que N(1) e N(5) possuem a maior porcentagem da densidade de spin total e assim o estado tripleto excitado da riboflavina ($S=1$) pode ser descrito como um biradical (62), como ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Formação do estado triplete excitado da riboflavina após exposição à radiação luminosa (440 nm). Adaptado de Huvaere, K.; Cardoso, D. R.; Homem-De-Mello, P. H.; Westermann, S.; Skibsted, L. H. Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins. *J. Phys. Chem. B*, v.114, p. 5583-5593, 2010.

Um subsequente e eficiente cruzamento intersistemas (ISC), $\Phi_{\text{ISC}} = 0,67$, promove a formação de um estado metaestável, denominado estado triplete excitado ($^3\text{Rib}^*$), de menor energia e maior tempo de vida (ca.15 μs em meio aquoso) (62,63).

É reportado que o estado triplete da riboflavina excitado sofre reação bimolecular com diversos substratos (64,65). Assim, como o potencial de redução é deslocado de $-0,3\text{ V}$ para a riboflavina no estado fundamental à $1,77\text{ V}$ vs. NHE para seu estado triplete excitado, pode-se dizer que a riboflavina passa a ser um potente oxidante quando fotoexcitada (64). Desta forma, a transferência de elétrons do substrato para o estado triplete excitado leva a formação do radical ânion semiquinona da riboflavina $\text{Rib}^{\bullet-}$ ($\text{pKa} \sim 8$) ou, dependendo do pH do meio reacional e mecanismo de reação (ET (transferência de elétrons) ou HAT (transferência de átomo de hidrogênio), SPLET (perda de próton seguida por transferência de elétrons) ou PCET (transferência de elétrons acoplada a prótons)), forma-se o radical semiquinona da riboflavina $\text{RibH}^{\bullet}$ ($E = -0,1\text{ V}$). O radical semiquinona pode então ser oxidado pelo oxigênio molecular levando a formação do íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, como o oxigênio no estado fundamental é uma

espécie triplete, reações de recombinação com radicais fotoinduzidos ocorrem rapidamente formando radicais peroxila reativos ($\text{ROO}^\bullet$), os quais podem promover danos em biomoléculas (1,63).

A Figura 11 ilustra as reações de fotosensibilização (Tipo I e Tipo II) os quais a riboflavina pode estar envolvida em meio biológico (64): oxidando diretamente um substrato, levando à formação de um cátion radical desse substrato e um ânion radical da riboflavina, o qual reduz o oxigênio molecular ao radical aniônico superóxido (Tipo I) ou então sendo desativada fisicamente por oxigênio molecular por transferência de energia, formando oxigênio singlete excitado (Tipo II) (65).

Figura 11. Mecanismo de atuação de flavinas como fotosensibilizador: Tipo I e Tipo II.

1.3. Ácidos Graxos

Antigamente os ácidos graxos eram vistos como uma forma eficiente de armazenar energia. Atualmente, sabe-se que uma dieta pobre em ácidos graxos está relacionada a problemas dérmicos e outras síndromes que podem levar até a morte (3,66,67,68,69). Baseado nisto criou-se então o conceito de ácidos graxos essenciais - ácidos graxos imprescindíveis ao organismo, os quais não podem ser sintetizados pelo organismo humano sendo necessário adquiri-los por meio da alimentação. Duas "famílias" de ácidos graxos são essenciais: os ácidos graxos ômega-3 (ou n-3), representados pelo ácido alfa-linolênico e os ácidos graxos ômega-6 (ou n-6), representados pelos ácidos linoléico e araquidônico. Os ácidos graxos ômega-3 apresentam a sua primeira dupla ligação entre os carbonos C3 e C4, enquanto que a família dos ácidos graxos ômega-6 apresenta a primeira dupla entre os carbonos C6 e C7 a partir do último grupo metílico da molécula (66,67).

Os ácidos graxos essenciais de cadeia longa: ácido araquidônico (n-6) AA; ácido eicosapentaenóico (n-3) EPA; e ácido docosaexaenóico (n-3) DHA fazem parte da estrutura dos fosfolídeos que são componentes importantes das membranas e da matriz estrutural de todas as células. Além de seu papel estrutural, esses lipídeos podem também modular a função celular ao atuarem como mediadores intracelulares da transdução de sinais e como moduladores das interações entre células (66,67).

A composição dos fosfolídeos de membranas na forma de ácidos graxos é, em parte, determinada pela composição dos ácidos graxos n-3 e n-6 da alimentação. Dessa forma, a composição da gordura alimentar pode influenciar várias funções relacionadas à membrana, tais como: ligação de hormônios e atividades associadas a enzimas e transportadores (55,67).

Os ácidos graxos EPA (C20:5 n-3) e DHA (C22:6 n-3) são encontrados em peixes de água salgada como o atum, a sardinha, o salmão e a cavala e em algumas sementes, como a linhaça (3,67,68,69).

Dentro a classe dos ácidos graxos encontram-se os ésteres de ácidos graxos que são feitos a partir da reação entre óleos e gorduras (lipídeos), com álcool (70,71).

Estudos com ácidos graxos na área de alimentos e bioquímica utilizam os ésteres de ácidos graxos na avaliação de alimentos funcionais, tais como, a composição em ácidos graxos em carnes, ácidos graxos ômega-3, manipulação de ácidos graxos em animais e de ácidos graxos maléficos à saúde humana (ácidos graxos *trans*) (70,71,72).

Os ésteres de ácidos graxos superiores, como palmitato de metila, estearato de metila, oleato de metila, o linoleato de metila, ecosapentanoato de metila foram aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) como uma fonte complementar de gordura para a alimentação animal e também podem ser utilizados como suplemento da ração de animais (73,74).

As estruturas químicas dos ésteres metílicos de ácidos graxos investigados encontram-se na Figura 12.

Figura 12. Estrutura química dos ésteres metílicos de ácidos graxos investigados.

1.3.1. Ácidos graxos e a prevenção de doenças na visão e na pele

Os raios UV-A e UV-B podem causar, no ser humano, várias disfunções estruturais e funcionais das biomoléculas DNA, proteínas e lipídeos, assim como desencadear estresse oxidativo às células (68) e causar efeitos adversos a curto e longo prazo na pele. A curto tempo incluem queimadura solares, fotosensitividade, e alterações imunológicas. A longo prazo, câncer e fotoenvelhecimento (75).

Doenças crônicas inflamatórias, como degeneração macular relacionada a idade (DMRI), estão relacionados a peroxidação lipídica e estresse oxidativo. O estresse oxidativo em proteínas, lipídeos e DNA podem causar danos e modificações em suas estruturas (68). Com o envelhecimento do indivíduo, há um aumento do estresse oxidativo podendo causar doenças como Alzheimer e Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Malondialdeído é um produto comum da peroxidação lipídica e está associado com muitas doenças como arteroesclerose e DMRI (68).

Sabe-se que a dieta é um dos meios mais eficientes para a atuação preventiva no desenvolvimento da DMRI. Há vários estudos relacionando os aspectos dietéticos da população com os tipos e fases da degeneração macular (3,5,69). Pesquisas mostram que dietas ricas em nutrientes antioxidantes, zinco e peixe ou ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 de cadeia longa (ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaheptaenóico (DHA)) estão associados a taxas mais baixas da DMRI. A ingestão de peixes, pelo menos uma vez por semana, pode reduzir em 40% o risco da doença precoce e a sua ingestão regular mostrou proteção contra a DMRI, mas apenas nos indivíduos com baixo consumo de ácido linoléico (3,69). O consumo de gordura total e o consumo de ácido linoleico foram relacionados com maior risco de DMRI em homens e mulheres, enquanto que o consumo de DHA apresentou melhora significativa (5). Além disso, o ácido docosaheptaenóico aumenta a sobrevivência dos foto-receptores em degenerações da retina e é importante para o funcionamento normal da mesma (76).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (EPA e DHA) também têm impacto no câncer. Eles podem inibir a carcinogênese, retardar o

crescimento de tumores e aumentar a eficácia da radioterapia e de várias drogas quimioterápicas (66,67).

Inibir os radicais gerados pelos raios UV-A e UV-B (os quais podem causar danos oxidativos a varias estrutura celulares) pode reduzir a inflamação dos efeitos causados pelos raios UV-A e UV-B na pele. Evidências recentes sugerem que a suplementação da dieta com óleos de peixes pode fazer isto. Há evidencias que a terapia com o óleo de peixe pode melhorar algumas doenças inflamatórias incluindo artrite reumatoide e psoríase (70,77). Uma pesquisa mostrou que dose relativamente baixa de óleo de peixe (2,8 g de EPA e 1,2 g de DHA) dentro de um curto período de tempo foi fotoprotetora para doenças inflamatórias da pele (77).

O benefício mais importante da ingestão de óleo de peixe pode ser atribuída aos seus efeitos anti-inflamatórios. Estes efeitos foram relatados como sendo o resultado da concorrência dos ácidos graxos n-3 com os ácidos graxos n-3 e n-6 como um substrato para a ciclo-oxigenase e lipoxigenase, resultando na formação de menos prostaglandinas e leucotrienos ativos (77). Por outro lado, ácidos graxos n-3 são instáveis e podem ser preferencialmente danificado por radicais, protegendo assim outras estruturas a partir de ataque por radicais (76,77).

1.4. Cafeína e metabólitos

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e seus metabólitos: 1,7-dimetilxantina (paraxantina), ácido 1,7-dimetil urico e ácido 1-metil urico, Figura 13, pertencem a classe de compostos pseudoalcalóides (78,79,80,81).

Figura 13. Estrutura química da cafeína, 1,7-dimetilxantina, ácido 1,7-dimetil urico e ácido 1-metil urico.

ácido 1-metil urico

ácido 1,7-dimetil urico

1,7-dimetilxantina

cafeína

A cafeína é considerada a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, por pessoas de todas as idades, independente do sexo e da localização geográfica. As principais fontes comuns de consumo são chá, café, produtos a base de chocolate e refrigerantes (79). Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como antigripais e moderadores de apetite, grande parte dela é ingerida na forma de bebidas (79,81,82).

Os principais efeitos fisiológicos da atuação da cafeína no organismo humano são o efeito estimulante, o efeito diurético e a dependência química. Entre outros efeitos, causa o aumento da taxa metabólica, o relaxamento da musculatura lisa dos brônquios, do trato biliar, do trato gastrointestinal e de partes do sistema vascular. Também aumentam a capacidade de alerta e redução da fadiga, com melhora no desempenho de atividades que requeiram maior vigilância e está relacionada a um menor risco de desenvolvimento da doença de Parkinson e Alzheimer (78,81,82).

A ingestão de cafeína em excesso pode causar vários sintomas desagradáveis incluindo a irritabilidade, dores de cabeça, insônia, diarreia, palpitações do coração. A dose letal para uma pessoa adulta pesando 70 kg é cerca de 10 g (78,82).

O efeito da ingestão de cafeína sobre o sistema cardiovascular ainda é motivo de controvérsia. Seu consumo regular parece elevar a pressão arterial de forma persistente e, desta forma, indivíduos com hipertensão, doença coronariana e arritmia cardíaca deveriam reduzir seus níveis de ingestão de cafeína (78,79,81,82).

Com relação à homeostase de cálcio, a cafeína não é prejudicial ao metabolismo ósseo de indivíduos cujo consumo de cálcio é adequado as suas necessidades metabólicas. Além disso, a cafeína é uma droga estimulante que pode ser usada indevidamente em atividades esportivas oficiais e, portanto, necessita ser monitorada continuamente durante as competições (81,82).

A cafeína é metabolizada no fígado principalmente por enzimas de fase I do sistema citocromo P-450 (CYP2A6) e entre seus metabólitos destacam-se a 1,7-dimetilxantina, ácido 1,7-dimetil urico e ácido 1-metil urico (78,82,83).

Um de seus metabólitos, o ácido 1,7-dimetil urico, apresenta alta atividade antioxidante e neuroprotetora. Verificou-se que quando o ácido 1,7-dimetil urico administrado por via intravenosa em ratos, houve uma diminuição nos danos cerebrais e melhoras da isquemia e acidente vascular cerebral (84).

1.4.1. Câncer de Pele, catarata e o consumo de cafeína.

O câncer de pele, que é uma das formas mais comuns de câncer no mundo de hoje, afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Carcinoma basocelular (CBC), carcinoma de células escamosas (SCC), e melanoma, são os tumores malignos mais frequentemente diagnosticados entre pessoas de pele clara nos Estados Unidos (8,9).

A forma mais comum de câncer de pele, carcinoma basocelular (responsável por 70% dos diagnósticos) é diagnosticada em milhões de

peessoas por ano. Este tipo de câncer não é fatal, mas, se não tratada, pode deixar a pele desfigurada (85).

A exposição aos raios UV-A e UV-B é o principal fator de risco exógeno associado a melanoma. Outro fator que deve ser levado em consideração é o tipo de pele já que pessoas com a pele, cabelos e olhos claros têm mais chances de sofrer câncer de pele, assim como aquelas que têm albinismo ou sardas pelo corpo. A idade é outro fator importante pois quanto mais avançada à idade maior é o tempo de exposição solar daquela pele (8, 9,85).

Estudos têm associado à ingestão de cafeína com redução do desenvolvimento de diferentes formas de câncer de pele (8,9,86). Foi mostrado que o consumo de cafeína a partir de todas as fontes (café, chá, refrigerante, ou chocolate) está relacionado ao baixo risco de incidência de câncer. Também mostraram que pessoas com maior ingestão de cafeína apresentaram um risco menor de câncer de pele quando comparado a pessoas com o menor consumo de cafeína (8,9). Quando se tratava de beber café com cafeína, os pesquisadores mostraram que as pessoas que bebiam três xícaras de café por dia, apresentaram um risco menor de desenvolvimento de câncer de pele do que as pessoas que só bebiam uma xícara de café por mês. Também relatou-se que o café descafeinado não foi associado com a mesma diminuição no carcinoma de células basais em comparação com o café com cafeína (8).

Verificou-se também que o consumo moderado de café foi associado com um aumento na concentração de vários marcadores inflamatórios, como a proteína reativa-C, interleucina 6, fator de necrose tumoral α , e amiloide A quando comparado a pessoas que não consomem café com frequência (87).

Pesquisas com ratos SKH-1 mostraram que a administração oral de cafeína, em 23 semanas, na água potável para estes ratos de alto risco inibiu a formação de queratoacantomas e carcinomas de células escamosas e os tumores por rato foram reduzidos em 57% e 65%, respectivamente (88). Já os chás descafeinados foram inativos, e os níveis de altas doses de chás descafeinados na verdade, aumentou a carcinogênese induzida por raios UV-A e UV-B (88).

Uma maneira de monitorar a presença de derivados da cafeína na pele foi através do uso de adesivo de absorção de suor (adesivo projetado para detectar o uso de drogas). O principal metabólito da cafeína, 1-metilxantina e

os metilureatos não são detectados por testes enzimáticos no plasma sanguíneo sugerindo uma origem extra-hepática para esses componentes (88). O estudo mostrou que derivados da cafeína poderiam ser monitorados transcutâneamente usando estes adesivos os quais se mostraram uma ferramenta simples para monitorar a N-desmetilação (os principais metabólitos da N-desmetilação são: paraxantina, teobromina, teofilina e 1-metilxantina) podendo ser uma ferramenta para prevenção do câncer de pele (8,88).

Sabe-se que cafeína é um eliminador eficaz de espécies reativas de oxigênio, principalmente radicais hidroxila, oxigênio singlete e seus metabolitos principais 1-metilxantina e ácido 1-metil urico também demonstraram atividade antioxidante significativa (89).

Como citado anteriormente os raios UV-A e UV-B podem desencadear estresse oxidativo às células causando doenças como, por exemplo, catarata.

Devido à capacidade antioxidante da cafeína, foram feitos estudos onde mostraram que ela previne a catarata (10,89).

Em um estudo recente, onde a catarata foi induzida pela alimentação de ratos jovens com uma dieta contendo 24% de galactose e outro grupo com a mesma dieta acrescida de 1% de cafeína, descobriram que no grupo da cafeína a catarata foi impedida mostrando que seu uso tópico têm sido eficaz na inibição da formação de catarata galactose, sugerindo fortemente a sua possível utilidade contra as cataratas diabéticas (10).

A administração de colírio a base de cafeína inibiu significativamente o início, bem como o progresso da formação de cataratas. Os efeitos são atribuídos à sua capacidade para prevenir o estresse oxidativo e consequente manutenção do metabolismo e das funções de transporte do tecido, além de prevenir a indução de apoptose (89).

Outra pesquisa feita com lentes do olho de rato onde um grupo foi exposto aos raios UV-A e UV-B e outro grupo foi adicionada cafeína, verificou-se que a cafeína ajudou a lente a permanecer saudável e neutralizar protegendo o cristalino contra os efeitos dos radicais gerados pelos raios UV-A e UV-B (89).

2. Objetivos Gerais

O objetivo geral desta tese é investigar a reatividade e o mecanismo de desativação dos estados excitados das flavinas na presença de diferentes substratos: vitamina D, colesterol, ergosterol, vitamina K, coenzima Q10; ésteres de ácidos graxos e da cafeína e seus metabólitos e delinear seu mecanismo de ação a nível molecular na proteção da pele e olhos frente aos efeitos deletérios da exposição a radiação luminosa. Para alcançar estes objetivos, o trabalho aqui desenvolvido foi dividido nas seguintes etapas:

- Identificação do mecanismo reacional entre flavinas e cada substrato, sendo do Tipo I ou Tipo II, e sua importância na degradação de alimentos.
- Determinação do rendimento quântico de fotodegradação dos substratos sensibilizados por flavina na ausência e presença de oxigênio;
- Identificação dos fotoprodutos majoritários;
- Estudo cinético da desativação dos estados singlete e triplete excitados da flavina por cada substratos;
- Determinação do potencial de oxidação das moléculas de interesse.

3. Procedimento experimental

3.1. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes e solventes utilizados.

Reagentes/Solventes	Procedência
água deionizada (18,2 MΩ. cm a 25 °C)	Sistema Milli-Q (Milipore)
fenantrolina	QHEMIS
oxalato de potássio	Reagen (Quimibras)
cloreto de ferro III. (6H ₂ O)	Merck
metanol (HPLC)	Tedia
riboflavina -5'-fosfato	Sigma-Aldrich
colecalfiferol	Sigma- Aldrich
ergosterol	Sigma- Aldrich
perclorato de lítio	Sigma- Aldrich
acetonitrila	Panreac
hexafluorofosfato de tetra-n-butilamônio	Sigma-Aldrich
terc-butanol (99,5%)	Acros Organics
etanol	Panreac
coenzima Q10	Sigma-Aldrich
vitamina K ₁	Sigma-Aldrich
oleato de metila	Sigma-Aldrich
ácido linoléico conjugado	Sigma-Aldrich
linoleato de metila	Sigma-Aldrich
linolenato de metila	Sigma- Aldrich
araquidonato de metila	Sigma-Aldrich
eicosapentanoato de metila	Sigma-Aldrich
docosahexanoato de metila	Sigma-Aldrich
cafeína	Sigma-Aldrich
ácido 1,7-dimetilurico	Sigma-Aldrich
ácido 1-metilurico	Sigma-Aldrich
1,7-dimetilxantina	Sigma-Aldrich
colesterol	Sigma- Aldrich

3.2. Fotólise

Os experimentos de fotodegradação foram realizados em uma bancada fotoquímica empregando-se radiação luminosa contínua, com comprimento de onda selecionado por filtro de interferência em 440 ± 10 nm. Cada sistema químico composto por lipídeo (colesterol, ergosterol e vitamina D, vitamina K, coenzima Q10) e flavina (Riboflavina ou FMN) foi irradiado em 440 nm, na presença e ausência de oxigênio. Todas as soluções foram preparadas em uma solução de terc-butanol/água 7/3 (v/v), exceto a vitamina K que foi preparada em solução de etanol.

A intensidade de radiação incidente foi determinada por uso de actinômetro químico ($K_3[Fe(C_2O_4)_3]$, tris(oxalato) ferrato de potássio, $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$), seguindo o procedimento descrito na literatura (90).

3.2.1. Preparação do sal de Parker $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ (90)

Foram dissolvidos 120 g de oxalato de potássio em 200 mL de água deionizada. Separadamente, também foram dissolvidos 82 g de cloreto de ferro III. $6H_2O$ 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 $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ do sal obtido utilizando como solvente uma solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido sulfúrico.

3.2.2. Cálculo da intensidade da lâmpada da bancada fotoquímica.

O actinômetro químico ferrioxalato de potássio $K_3[Fe(C_2O_4)_3]$ é um actinômetro bastante sensível e exato na faixa de excitação de 253-577 nm. 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 número 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 ($\sim 1,11 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

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;

Φ_{Fe} = rendimento quântico de formação do íon Fe^{2+} no comprimento da luz irradiada;

3.2.3. Determinação do rendimento quântico.

Preparou-se uma solução individual de cada lipídeo (colesterol, ergosterol, vitamina D, coenzima Q10 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em terc-butanol/água 7/3 (v/v)) e vitamina K ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em etanol e duas soluções de riboflavina $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (uma preparada em etanol e outra em terc-butanol/água 7/3 (v/v)). Cada lipídeo foi irradiado com riboflavina por um tempo determinado (90 min para ergosterol, 60 min para o colesterol e 120 min para a vitamina D, 180 min para a vitamina K e 120 min para a coenzima Q10) 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 dos lipídeos através de uma curva de calibração externa utilizando-se um cromatógrafo líquido constituído por duas bombas Shimadzu modelo LC20AD, amostrador modelo Triahlon da Spark com loop de 20 μL acoplado a um detector UV-visível de arranjo de diodos Shimadzu modelo SPD-M20A. Para a análise do colesterol, ergosterol e vitamina D, utilizou-se como fase móvel: fase A- metanol (50%) e fase B- acetonitrila (50%), sendo o modo de eluição isocrático. A coluna utilizada foi Waters spherisorb C-18 com dimensões 4,6 x 250 mm e 5 μm de partícula. O fluxo utilizado foi de $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL . Já para a vitamina K utilizou-se como fase móvel: fase A- água (10%) e fase B- metanol (90%), sendo o modo de eluição isocrático. A coluna utilizada foi Waters spherisorb C-18 com dimensões 4,6 x 250 mm e 5 μm de partícula. O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL . Para a análise da CoQ10 utilizou-se como fase móvel: água (5%), acetonitrila (55%) e tetrahidrofurano (40%) sendo o modo de eluição isocrático. A coluna utilizada foi uma Agilent Zorbax eclipse XDB C-18 com dimensões 4,6 x 150 mm e 5 μm de partícula. O fluxo utilizado foi de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 20 μL . Com os valores de intensidade da luz e o número de mols de cada esteroide determinou-se o valor do rendimento quântico.

3.3. Espectroscopia de Fluorescência Molecular

As medidas de fluorescência foram realizadas em um fluorímetro Hitachi modelo F-4500, utilizando-se cubeta de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico. A velocidade de escaneamento foi de 1200 nm.min⁻¹. A abertura das fendas de excitação/emissão foram de 5/5 mm, respectivamente.

Os tempos de vida de fluorescência foram determinados em um instrumento de contagem de fótons resolvido no tempo. Para tanto se utilizou um espectrômetro equipado com polarizadores Glan-laser e detector do tipo MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu) resfriado por um sistema Peltier. Os pulsos de 200 fs na região de 700-900 nm foram gerados através de um laser de alta intensidade e pulsos ultracurtos constituídos por um Laser Verdi/Coherent de 5W bombeando um laser de Ti-Safira (Coherent Mira Modelo XW).

Os decaimentos de fluorescência foram tomados com contagens de 5×10^3 fótons e incremento de tempo de 25 ps por canal de aquisição. Os fótons emitidos foram coletados por um detector MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu), resfriado por um sistema de Peltier e a eletrônica de contagem foi baseada na placa de aquisição TCC 900 (Edinburgh Instruments).

Os tempos de vida de fluorescência foram determinados por análise de reconvolução, a qual envolve a convolução do decaimento da amostra com a resposta instrumental (IRF – Instrument Response Function).

3.4. Laser Flash fotólise com detecção de Absorção da transientes

Para analisar a desativação do estado triplete utilizou-se a técnica de fotólise por pulso de laser resolvida no tempo com resolução temporal de nano segundos LFP-112 da Luzchem utilizando-se de uma fotomultiplicadora de 9 estágios e um digitalizador Tektronix TDS 2012. A excitação da amostra foi obtida usando o terceiro harmônico (355 nm) de um laser de Nd:YAG atenuado a 10 mJ. cm⁻² e resolução temporal de 8 ns. 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 média de 32 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 MatLabR2009 (The MathWorks, Natick, MA, EUA). Todos os experimentos foram realizados com soluções termostatzadas a $25,0 \pm 0,5$ °C e previamente saturadas com N₂ (5.0) por 30 minutos antes do experimento.

3.5. Voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica de cada lipídeo ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) foram realizadas em acetonitrila contendo 50 mM de LiClO₄, utilizando-se de um potenciostato EGG PAR (Princeton Applied Research), modelo 264A. A cafeína e seus metabólitos ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) foram preparados separadamente em tampão fosfato pH= 6,4 contendo 50 mmol.L⁻¹ de hexafluorofosfato de tetra-N-butilamônio. Os experimentos foram realizados em uma cela termoestatzada a 25°C em atmosfera de nitrogênio. Os eletrodos utilizados foram: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e platina (contra-eletrodo). A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s⁻¹.

3.6 LC-SPE-RMN

O sistema LC-SPE-RMN foi utilizado para separar e analisar o fotoproduto gerado pela irradiação da solução de vitamina D ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) /flavina ($1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) por luz monocromática em 440 nm. A amostra da solução irradiada foi analisada por LC-SPE. A separação cromatográfica foi feita utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 (2,1 mm x 150 mm x 50 µm) da Agilent modelo Extend. O volume de injeção foi de 25 µL. A separação cromatográfica foi realizada em modo isocrático 15% B (fases móveis: A = ACN/H₂O (80:20 v/v) and B= MeOH) com fluxo de 1,0 mL/min. Os picos de interesse foram detectados usando detector de UV em 265 nm. Após a

separação cromatográfica, os picos dos analitos foram retidos em cartuchos de SPE usando Spark Holland (Emmen, Holland) hífenado ao instrumento LC-DAD; o pico alvo, a partir de 10 separações cromatográficas, foi sequencialmente retido no cartucho de SPE assegurando uma quantidade de massa suficiente para a análise de RMN. Um fluxo de composição de eluente A em uma proporção de 10:1 foi adicionada ao eluato pós-coluna, a fim de melhorar a retenção. Após o processo de retenção, os cartuchos foram secos com nitrogênio de alta pureza para remover os solventes residuais. Metanol deuterado foi usado para lavar o cartucho SPE diretamente no frasco de amostras e em seguida fez-se a análise de RMN.

3.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados para caracterizar o fotoproduto isolado por LC-SPE (o qual foi gerado pela irradiação da solução de vitamina D/flavina). Utilizou-se um espectrômetro de 600 MHz NMR Bruker Avance-III equipado com um ^1H $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ tripla-ressonância inversa cryoprobe (TCI). O experimento de ^1H foi baseado na versão 1D da sequência NOESY com pré-saturação dupla dos sinais de metanol e água. O espectro foi adquirido com 32 transientes usando 16k pontos de dados em uma largura espectral 9578,54 Hz, dando um tempo de aquisição de 3,42 s, sendo o delay de relaxamento para pré-saturação de 4 s. O processamento foi realizado utilizando multiplicação exponencial, a aplicação de um fator de ampliação de linha de 0,5 Hz.

3.8. Espectrometria de Massas

O fotoproduto separado da solução irradiada de vitamina D/flavina por LC-SPE também foi analisado por espectrômetro de massas de alta resolução em de um espectrômetro LTQ-Orbitrap Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) operando em modo positivo. Condições gerais: temperatura de

aquecimento: 50°C, fluxo do gás auxiliar: 5 (arbitrário), voltagem do eletrospray: 3,7 Kv, temperatura do capilar: 275°C, fluxo: 5 µL/min.

Os fotoprodutos gerados da irradiação da riboflavina com a vitamina K também foram analisados por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) com detecção no modo negativo. As fases móveis utilizadas foram as mesmas citadas no item 3.6 só que ambas foram acidificadas com ácido fórmico 0,1% (v/v). As condições utilizadas para a análise da vitamina K foram: tempo de corrida: 60 min, Fluxo: 500 uL/min, Ionização: Electrospray, voltagem do eletrospray: 3,1 kV, pressão do gás de nebulização: 60 psi, fluxo do gás auxiliar: 20 (arbitrário), temperatura do aquecedor: 400°C, temperatura do capilar: 380°C, volume de amostra injetado: 10uL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reatividade do Colesterol e Ergosterol frente aos estados excitados de flavinas

A Figura 14 ilustra os espectros eletrônicos de absorção do colesterol, ergosterol e da riboflavina. Observa-se claramente que ambos esteroides apresentam intensa absorção em comprimento de onda menor abaixo de 400 nm sendo e que apenas a riboflavina absorve na região do azul (> 380 nm) demonstrando a ausência de interferência espectral na região de excitação com a terceira harmônica de um laser pulsado de Nd:YAG, i.e. 355 nm.

Figura 14. Espectro eletrônico de absorção de uma solução de colesterol ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$), ergosterol ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$) e de riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$), em terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25 °C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

A Figura 15 ilustra o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações do colesterol e do ergosterol; ambos com as concentrações variando de não presente até a concentração de $4,0 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$. Observa-se que a intensidade de emissão de fluorescência da

riboflavina singlete excitada diminui linearmente, em ambos os casos, com o aumento da concentração dos supressores (ergosterol e colesterol).

Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em terc-butanol/água 7:3 (v/v) na presença de concentrações crescentes de: a) colesterol e b) ergosterol a 25°C. $\lambda_{exc} = 440$ nm e $\lambda_{emissão} = 520$ nm.

Através dos valores coletados 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 através dos espectros ilustrados na Figura 15, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica do colesterol e do ergosterol, Figura 16, e através da equação de Stern-Volmer pode-se obter o valor da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelos supressores:

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

onde:

I_0 e I são as intensidades de fluorescência na ausência e presença dos supressores (colesterol e ergosterol); k_q é a constante de velocidade bimolecular de desativação do estado singlete excitado; $[M]$ é a concentração analítica do supressor; τ_0 é o tempo de vida do estado singlete excitado na ausência do supressor; K_d é a constante de supressão de Stern-Volmer.

Figura 16. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pelos esteróis a 25 °C em meio de terc-butanol/água 7:3 (v/v): a) colesterol e b) ergosterol.

Sabendo que o tempo de vida, τ_0 , da riboflavina singlete excitada é de 4,86 ns (valor determinado experimentalmente por fluorescência resolvida no tempo em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v)) e que com o valor do coeficiente angular obtido por regressão linear, Figura 16, obteve-se as constantes de velocidade bimolecular de desativação (1k_q) do estado singlete excitado ($1,1 \times 10^{13} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o colesterol e $7,3 \times 10^{12} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o colesterol). Os valores da constante de supressão estão acima do esperado para reações bimoleculares controladas por difusão, o que pode ser explicado pelo empilhamento planar dos esteróis com a riboflavina no estado fundamental e dá indicio de que esteja ocorrendo uma supressão estática (6).

A análise de fluorescência resolvida no tempo confirmou os resultados de fluorescência obtidos anteriormente. A Figura 17 refere-se às medidas de fluorescência resolvida no tempo da riboflavina na presença dos esteróis. Verifica-se que mesmo aumentando a concentração dos esteróis em solução ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, para cada esterol) os tempos de vida de cada um deles se mantêm constante e praticamente os mesmos quando comparado ao da riboflavina (em torno de $4,87 \pm 0,02 \text{ ns}$ para o colesterol e $4,86 \pm 0,02 \text{ ns}$ para o ergosterol e para a riboflavina $4,86 \pm 0,02 \text{ ns}$ ambos preparados com solução terc-butanol/água 7:3 (v/v)). Estes dados confirmam a supressão como sendo estática entre fotosensibilizador e supressor, ou seja, ocorre a formação de um complexo [riboflavina....esterol] no estado fundamental.

Figura 17. Decaimento de fluorescência da riboflavina na: a) ausência do supressor e na presença dos supressores: b) ergosterol e c) colesterol preparados em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25 °C.

A desativação do estado excitado triplete da riboflavina pelos esteróis foi investigada por espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise por pulso de laser. Primeiramente foi registrado o espectro da diferença de absorbância do estado triplete excitado da riboflavina (T-T) 0,8 μ s após o pulso de laser de 355 nm (energia $\cong 10 \text{ mJ.cm}^2$) com duração de 8 ns, Figura 18, onde verifica-se o máximo de absorção do estado triplete excitado em 720 nm. O espectro, Figura 18, apresenta-se similar ao previamente reportado (65) para o estado triplete 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 18. Espectro eletrônico da ΔAbs do estado triplete excitado da riboflavina (T-T) registrado 0,8 μs após o pulso de laser de com energia $\cong 10 \text{ mJ.cm}^2$ a 25 °C em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v). A seta indica a região de máxima absorção da riboflavina (720 nm).

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 dos esteróis, sob condições anaeróbicas, verifica-se que o decaimento da riboflavina triplete ocorre exponencialmente e é acelerado pela presença do colesterol e do ergosterol, Figura 19. Conforme ilustrado na Figura 18 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, $A = A_0 * \exp(-k_{obs}t) + C$ às curvas de decaimento do estado triplete metaestável da riboflavina monitorada a 720 nm, Figura 19.

Figura 19. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração dos supressores, colesterol e ergosterol, preparados em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a 25 °C, (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm^2).

Através da análise do gráfico da constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem *versus* à concentração do supressor, Figura 20, foi possível extrair as constantes de velocidade específica para a desativação através do coeficiente angular obtido da linearização do gráfico:

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

em que, k_{obs} é a constante observada de pseudo-primeira ordem, k_o 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 $[\text{supressor}]$ é a concentração molar do supressor.

Figura 20. Gráfico de k_{obs} *versus* [esterol] a 25 °C: a) colesterol e b) ergosterol.

Os valores obtidos experimentalmente para as constantes de velocidade específica (3k_q) obtidas foram: $6,2 \pm 0,5 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o colesterol e $0,9 \pm 0,4 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o ergosterol.

Os valores de 3k_q estão próximos ao do limite da difusão. Ao comparar a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pelos esteróis com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da riboflavina por oxigênio molecular ($9,8 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$), verifica-se que ambos são competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento em termos de teores dos lipídeos, oxigênio molecular dissolvido, e da presença de outros supressores (65).

Com o intuito de se verificar o potencial de oxidação dos esteróis, foram realizados experimentos de voltametria cíclica. A janela de potencial utilizada foi de 0,0 a 2,2 V usando o eletrodo Ag/AgCl como referência. Os voltamogramas podem ser observados na Figura 21.

Figura 21. Voltamogramas cíclicos dos esteróis: a) colesterol e b) ergosterol ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em ACN contendo 50 mmol.L^{-1} de LiClO_4 , utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo) a 25°C . A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s^{-1} .

Os potenciais foram corrigidos com o par Fc/Fc^+ . O potencial de oxidação obtido para o ergosterol foi $E_{1/2} = 1,4 \text{ V}$ e para o colesterol $E_{1/2} = 1,7 \text{ V}$ (NHE).

Com o intuito de obter informações sobre a transferência de elétrons procurou-se obter dados termodinâmicos de cada sistema riboflavina/esterol. 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, E_{ox}^{D} é o potencial de ionização do doador, $E_{\text{red}}^{\text{A}}$ é a afinidade eletrônica do aceitor; o fator coulômbico em função do solvente é de $0,06 \text{ eV}$ para acetonitrila (90), e $\Delta E_{0,0}$ é a diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental da riboflavina. O Valor de $\Delta E_{0,0}$ para os estados singlete e triplete são $239,3 \text{ KJ.mol}^{-1}$ e $208,2 \text{ KJ.mol}^{-1}$, respectivamente (92). O potencial

de redução da riboflavina é de - 0,29V vs NHE (64). A tabela 4 contem os valores de ΔG° calculados.

Tabela 4. Valores de ΔG° para a reação entre esteróis com os estados singlete e triplete da riboflavina.

	$\Delta G_{.S}^\circ$ (KJmol ⁻¹)	$\Delta G_{.T}^\circ$ (KJmol ⁻¹)
Ergosterol	-76,5	-45,3
Colesterol	-58,0	-26,7

Quando uma reação é exergônica ($\Delta G^\circ < 0$), pode-se assegurar que a transferência de elétrons ocorrerá com uma alta constante de velocidade. Em uma reação endergônica ($\Delta G^\circ > 0$), pode-se eliminar a possibilidade de transferência eletrônica (93). Os valores negativos de ΔG° obtidos indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente tanto para o processo de desativação do estado triplete excitado quanto para o do singlete excitado.

Outro possível mecanismo de reação operando no processo de desativação do estado triplete das flavinas é a transferência de átomo de hidrogênio (HAT). O fator termodinâmico limitante para HAT é a energia de dissociação (BDE) ser inferior a 300 KJ/mol (1). O valor da BDE é conhecido da literatura e apresenta valores de 328 KJ/mol para a ligação C₇-H para o colesterol e 296 KJ/mol para a ligação C₁₄-H do ergosterol (6).

O colesterol apresenta um valor de BDE maior que 300 KJ/mol, podendo descartar a possibilidade de HAT. Neste sentido então ocorre um processo de transferência de elétrons. No caso do ergosterol o valor de BDE é um pouco menor que 300 KJ/mol sugerindo que o mecanismo reacional operante é o de transferência de elétrons.

Em adição aos dados cinéticos e termodinâmicos sugerindo o mecanismo do Tipo I como predominante para a fotodegradação sensibilizada por flavinas, foram coletados dados referente ao rendimento quântico deste fotoprocessos em condições aeróbicas e anaeróbicas. Desta forma, para se calcular o rendimento quântico utilizou-se o método actinométrico para calcular a intensidade do fluxo da radiação da luminosa. As intensidades calculadas

foram de: $2,5 \times 10^{-8}$ Eistein.min⁻¹ para o colesterol e $2,1 \times 10^{-8}$ Eistein.min⁻¹ para o ergosterol.

Após se determinar o valor da intensidade da luz incidente em função do tempo de irradiação, calculou-se o número de fótons a partir da equação:

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

Desta maneira, a determinação quantitativa do teor dos esteróis remanescente após a fotólise de uma solução de riboflavina com os esteróis por 60 minutos para o colesterol e 90 minutos para o ergosterol, com irradiação luminosa em 440 nm, permitiu o cálculo do rendimento quântico de degradação dos esteróis sensibilizados pela flavina, utilizando-se a 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 dos esteróis sensibilizados pela riboflavina encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimento quântico de degradação dos esteróis sensibilizados pela riboflavina na ausência e presença de O₂.

Colesterol na ausência O₂	Colesterol na ausência O₂	Ergosterol na presença O₂	Ergosterol na presença O₂
0,20	0,44	0,22	0,48
0,18	0,42	0,25	0,50
0,20	0,41	0,23	0,51

Ao comparar o rendimento quântico das soluções em condições aeróbicas e anaeróbicas, verifica-se um maior rendimento para a solução anaeróbica. Neste sentido indicando o mecanismo reacional do Tipo I é predominante no processo de degradação dos esteróis investigados.

4.2. Reatividade da vitamina D frente aos estados excitados de flavinas

O espectro eletrônico de absorção da vitamina D ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$) encontra-se ilustrado na Figura 22. Observa-se que esta não apresenta absorção em comprimento de onda superior a 400 nm sendo que somente a riboflavina apresenta absorção nesta região e assim não há interferência espectral para a fotoexcitação em 355 nm.

Figura 22. Espectro eletrônico de absorção da vitamina D ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$) em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

A Figura 23 ilustra o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações da vitamina D (ambos com as concentrações variando de ausente até a concentração de $8,0 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$) e em diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C e 45°C. Também se observa que a intensidade de emissão de fluorescência da riboflavina singlete excitada diminui com o aumento da concentração do supressor (vitamina D).

Figura 23. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) na presença de concentrações crescentes da vitamina D (em terc-butanol/água 7:3 (v/v)) e registrado em diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C e 45°C. $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 520$ nm.

Com os valores de I_0 e I de fluorescência na presença de crescentes concentrações da vitamina D obtidos pelos gráficos acima, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica da vitamina D, Figura 24, e através da equação de Stern-Volmer pode-se calcular os valores da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo supressor, Tabela 6.

Figura 24. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pela vitamina D em diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C e 45°C.

Tabela 6. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela vitamina D em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	1k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
15	$3,7 \pm 0,1 \times 10^{12}$
25	$3,5 \pm 0,1 \times 10^{12}$
35	$3,4 \pm 0,1 \times 10^{12}$
45	$3,2 \pm 0,1 \times 10^{12}$

Ao comparar as constantes de supressão, 1k_q , para as diferentes temperaturas, nota-se que, conforme a temperatura é elevada, o valor da

constante de supressão diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura, sugerindo a formação de um complexo precursor [rib....vitamina D]. A análise de fluorescência resolvida no tempo também confirmou os resultados acima. A Figura 25 refere-se às medidas de fluorescência resolvida no tempo da riboflavina na presença da vitamina D ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹). Verifica-se que o tempo de vida para cada solução se mantém constante e praticamente os mesmos quando comparado ao da riboflavina (em torno de $4,87 \pm 0,02$ ns para vitamina D e para a riboflavina $4,86 \pm 0,02$ ns). Estes dados reconfirmam que ocorre a formação de um complexo rib-vitamina D no estado fundamental.

Figura 25. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da vitamina D em solução de terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C.

A formação desse complexo pode ser representada de acordo com a seguinte reação:

O número de moléculas de supressor ligados ao fluoróforo foi calculado através da equação:

$$\log [(I_0 - I) / I] = \log K_a + n \cdot \log [Q]$$

em que:

I e I_0 são as intensidade de fluorescência na presença e ausência dos supressores; K_a é a constante de associação; n é o número de supressores ligados ao fluoróforo; Q é a concentração do supressor.

A Figura 26 e a tabela 7 mostram as curvas e parâmetros da equação anterior, respectivamente.

Figura 26. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a vitamina D em diferentes temperaturas.

Tabela 7. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a vitamina D, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para diferentes temperaturas.

T (°C)	constantes de associação - K_a (L.mol⁻¹)	número de sítios de ligação – n
15	$7 \pm 3 \times 10^4$	$1,10 \pm 0,03$
25	$4 \pm 3 \times 10^4$	$0,85 \pm 0,04$
35	$3 \pm 2 \times 10^4$	$1,04 \pm 0,01$
45	$1 \pm 1 \times 10^4$	$0,96 \pm 0,01$

Os valores reportados na Tabela 7 demonstram que a formação do complexo precursor riboflavina...vitamina-D ocorre com a existência de apenas uma riboflavina por sítio de ligação na vitamina D independente da temperatura investigada (94,95).

Os cálculos referentes aos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo precursor (riboflavina-vitamina D)n foram realizados com base nos dados da tabela 6 e em acordo com a equação de Van't Hoff :

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

em que:

K_a = constante de equilíbrio; R = constante universal dos gases perfeitos (8,314); T= temperatura (em K); ΔH^0 = variação de entalpia; ΔS^0 = variação de entropia.

A partir do gráfico da Figura 27, obteve-se os valores de $\Delta H^0 = -36 \pm 7$ KJ.mol⁻¹ e $\Delta S^0 = -5 \pm 3$ J.mol⁻¹.K⁻¹.

Figura 27. Ajuste linear da equação de Van't Hoff.

Estes dados termodinâmicos obtidos demonstram que a reação de complexação entre a riboflavina e a vitamina D é exotérmica com estequiometria 1:1 e ocorre por interações de caráter hidrofóbico. A diminuição na entropia também sugere uma interação hidrofóbica forte, tendo em vista que o anel isoaloxazina da riboflavina é hidrofóbico sugere-se então que a complexação ocorre entre a porção hidrofóbica da vitamina D com o anel isoaloxazina (94,95).

A técnica de espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser foi utilizada para verificar a interação da vitamina D com o estado triplete da riboflavina. Como consequência de um eficiente cruzamento intersistema da riboflavina singlete para o seu estado triplete de menor energia, ela torna-se fortemente reativa devido a exposição à luz (como na pele ou em produtos lácteos). A vitamina D pode reagir com a ^3Rib na pele, e esta reação foi estudada usando espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser.

A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem foi calculada através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, $A = A_0 * \exp(-k_{\text{obs}}t) + C$ às curvas de decaimento do estado triplete metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, Figura 28.

Figura 28. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25°C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10mJ.cm²).

A partir da regressão linear do gráfico de k_{obs} (Figura 29) *versus* a concentração da vitamina D, e de acordo com a equação $k_{obs} = k_0 + k_q \cdot [\text{supressor}]$, obteve-se a constante de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina de $^3k_q = 1,4 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Figura 29. Gráfico de k_{obs} *versus* [vitamina D] a 25°C.

O valor de 3k_q também está próximo ao do limite da difusão. Verifica-se que a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pela vitamina D com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da

riboflavina pelo oxigênio molecular, também são competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento.

No entanto, em micelas aquosas de Tween-20, que atuam como uma sonda para a reatividade em microdomínios da ^3Rib junto com a vitamina D, a qual está localizado no interior do núcleo hidrofóbico dos agregados micelares, a ^3Rib apresentou um decaimento triplo-exponencial, Figura 30.

Figura 30. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm^{-2}) para os microdomínios em micelas de Tween-20 a 25°C e uma ilustração gráfica destes microdomínios. Gráfico de k_{obs} para a reação em cada microdomínios (fase contínua, a interface micela, e núcleo hidrofóbico dos agregados micelares).

Os valores de k_{obs} para cada microdomínio foram determinados ao aumentar as concentrações de vitamina D, juntamente com a percentagem estimada de distribuição da ^3Rib nos três microdomínios observados (média de

89,4% na fase contínua, de 9,6% na interface e 1% na fase dispersa na presença de vitamina D). A Figura 30 mostra a dependência linear de k_{obs} para cada microdomínio com concentrações crescentes da vitamina D, obtendo-se a constante de velocidade para a desativação do estado triplete da Rib pela vitamina D nos três ambientes diferentes: $k_1 = 6,9 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a reação na fase contínua (fora da micela), $k_2 = 7,1 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a reação na interface da micela e $k_3 = 7,2 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a reação no interior do núcleo hidrofóbico da micela. A Figura 29 também ilustra os três microdomínios diferentes da desativação da ^3Rib pela vitamina D em micelas de Tween-20. Os resultados cinéticos em micelas de Tween-20 fornecem fortes evidências de que ^3Rib pode ser desativada pela vitamina D na interface da membrana celular ou no interior da membrana plasmática quando está presente como uma flavoproteína, como a NAD(P)H oxidase.

Foram obtidos os valores do rendimento quântico deste fotoprocesso em condições aeróbicas e anaeróbicas a fim de se confirmar o mecanismo do Tipo I como predominante para a fotodegradação da vitamina D sensibilizada por flavinas.

Desta forma, também foi calculado o rendimento quântico através do método actinométrico. A intensidade do fluxo da radiação da luminosa foi de $I = 2,5 \times 10^{-8} \text{ Einstein.min}^{-1}$. Após determinar-se o valor da intensidade da luz incidente, calculou-se o número de fótons.

Determinando a quantitativa do teor da vitamina D remanescente após a fotólise da solução riboflavina/vitamina D por 120 minutos, com irradiação luminosa em 440 nm, pode-se calcular o rendimento quântico de degradação da vitamina D sensibilizada pela flavina. Os valores obtidos de rendimento quântico encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimento quântico de degradação da vit D sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O_2 .

ausência O_2	presença O_2
0,14	0,31
0,15	0,32
0,17	0,34

Ao comparar o rendimento quântico das soluções em condições aeróbicas e anaeróbicas, verifica-se um rendimento quântico maior para a solução anaeróbica, indicando que o mecanismo reacional predominante no processo de degradação da vitamina D é do Tipo I.

Com o propósito de obter maiores informação sobre o fotoproduto gerado pela irradiação da solução de rib/vit D (120 minutos por luz monocromática em 440 nm), este foi isolado por extração em LC-SPE e analisado por espectrometria de massas de alta resolução e por ressonância magnética nuclear (RMN).

Os cromatogramas obtidos da solução analisada por LC-SPE estão mostrados na Figura 31. Em 31-a verifica-se um pico de eluição (pico 1) com tempo de retenção em 20 minutos referente ao padrão da vitamina D. Em 31-b o pico 2 com tempo de retenção de 18 minutos refere-se ao fotoproduto formado.

Figura 31. Cromatograma obtido do padrão da vitamina D (a) e do fotoproduto (b).

O espectro de massas de alta resolução, realizado em modo positivo, apresentou dois picos (Figura 32): um referente ao fotoproduto $[M + Na]^+ = 407,3287 \text{ m/z} \pm 0,6 \text{ ppm}$, calculada para $C_{27}H_{48}ONa$ e outro $[M + Na]^+ = 408,3319 \text{ m/z} \pm 0,4 \text{ ppm}$, calculada para $C_{26}^{13}CH_{48}ONa$ referente a vitamina D_3 formando um aduto com o sódio. Como a massa do fotoproduto é igual a massa da vitamina D pode-se sugerir que ocorre a formação de algum isômero da vitamina D_3 .

Figura 32. Espectro de massas do fotoproduto (pico 2) isolado por LC-SPE.

O espectro de ^1H RMN obtido do produto de degradação da irradiação é mostrado na Figura 33. Verifica-se ausência de sinais na região de 0-7 ppm. Baseado nos deslocamentos químicos dos isômeros da vitamina D obtidos experimentalmente e da literatura (96,97,98), os quais se encontram na Tabela 9, verificou-se que o produto de degradação refere-se ao isômero *trans*-vitamina D₃.

Figura 33. Espectro de ^1H RMN do fotoproduto.

Tabela 9. Deslocamentos químicos de ^1H -RMN obtido do espectro do fotoproduto e da literatura.

	δ (medido)	δ (literatura)
H-6	6,43	6,50
H-7	5,85	5,84
H-19Z	4,97	4,95
H-19E	4,63	4,65
H-3 α	3,90	3,86
H-4 α	2,85	2,84
H-9 β	2,85	2,84
H-1 β	2,42	2,44
H-4 β	2,31	2,31
H-1 α	2,19	2,17
H-2 α	1,91	1,94
H-2 β	1,55	1,58
CH ₃ -21	0,91	0,92
(CH ₃) ₂ -26,27	0,85	0,87

Outra evidencia que sugere que o fotoproduto obtido é o isômero 5,6-trans-vit.D₃ é o espectro de absorção de UV-vis dele isolado, o qual apresenta absorção máxima a 274 nm, como pode ser visto na Figura 34 (99).

Figura 34. Espectro eletrônico de absorção do fotoproduto isolado da vitamina D₃ a 25^oC.

Com o intuito de se verificar o potencial de oxidação da vitamina D, foram realizados experimentos de voltametria cíclica. A janela de potencial utilizada foi de 0,0 a 2,2 V, usando o eletrodo Ag/AgCl como referência. Na Figura 35 observa-se o voltamograma obtido experimentalmente.

Figura 35. Voltamograma da vitamina D ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em ACN contendo 50 mmol.L^{-1} de LiClO_4 , utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo) a 25°C . A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s^{-1} .

Os potenciais foram corrigidos com o par Fc/Fc^+ . O potencial de oxidação obtido para a vit D foi $E_{1/2} = 1,6\text{V}$ (NHE). Os valores de ΔG° para o processo de transferência de elétrons entre riboflavina e vit D foram obtidos a partir da equação de Rehm-Weller. Os Valores de ΔG° são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de ΔG° para a reação entre vitamina D com os estados singlete e triplete da riboflavina.

	$\Delta G_s \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_T \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$
Vitamina D	-67,0	-3,8

Apesar de ser possível o processo de transferência de elétrons verificou-se que nenhum produto da oxidação da vitamina D foi detectado, somente produto da isomerização, o que se elimina a possibilidade de ocorrer um processo de transferência de elétrons.

O mecanismo de transferência de energia envolvendo a $^3\text{Rib}^*$ e a da vitamina D está ilustrado no esquema 2. A energia do triplete da vitamina D é de 200 KJ.mol^{-1} enquanto que a energia do triplete da 5,6-*trans*-vitamina D é

menor sendo próximo a 170 KJ.mol^{-1} , mas ambas são comparáveis a da riboflavina triplete (98).

O processo que ocorre é um processo onde primeiro a vit D doa um elétron para o orbital de menor energia da $^3\text{Rib}^*$ (SOMO) com a formação de um par de íons radical [$^2\text{Rib}^{\cdot-} \dots ^2\text{VitD}^{\cdot+}$] seguido de transferência de elétrons do orbital SOMO da $^2\text{Rib}^{\cdot-}$ para o orbital LUMO da $^2\text{VitD}^{\cdot+}$. A $^3\text{Rib}^*$ é desativada voltando a Rib (fundamental) e a vitamina D forma-se a $^3\text{VitD}^*$. A $^3\text{VitD}$ pode rotacionar ao redor das ligações 5,6- e 7,8- gerando a espécie 5,6-*trans*-vitamina D (esquema 2).

Esquema 2. Mecanismo proposto para a isomerização da 5,6-*trans*-vitD₃ através do mecanismo de transferência de energia de Dexter.

4.3. Reatividade da vitamina K frente aos estados excitados de flavinas

A Figura 36 ilustrado o espectro eletrônico de absorção da vitamina K ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Observa-se também que somente a riboflavina apresenta absorção na região de 440 nm.

Figura 36. Espectro eletrônico de absorção da vitamina K ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução de etanol/água 9:1 (v/v) a 25°C . A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

A Figura 37 ilustra o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações da vitamina K (concentrações variaram de não presente até a concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). Observa-se que a intensidade de emissão de fluorescência da riboflavina singlete excitada diminui com o aumento da concentração da vitamina K.

Figura 37. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em solução etanol/água 9:1 (v/v) na presença de concentrações crescentes de vitamina K (de ausente a $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35°C). $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 520$ nm.

Através dos valores coletados de intensidade de fluorescência na ausência do supressor (I_0) e da intensidade de fluorescência na presença de crescentes concentrações analíticas do supressor, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica da vitamina K, Figura 38, e através da equação de Stern-Volmer calculou o valor da constante de desativação do estado

singlete excitado da riboflavina pelo supressor. Os valores da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo supressor encontram-se na Tabela 11.

Figura 38. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pela vitamina K em diferentes temperaturas.

Tabela 11. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela vitamina K em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	1k_q (L.mol ⁻¹ . s ⁻¹)
15	$3,9 \pm 0,1 \times 10^{11}$
20	$3,5 \pm 0,2 \times 10^{11}$
25	$3,3 \pm 0,1 \times 10^{11}$
30	$3,1 \pm 0,1 \times 10^{11}$
35	$2,9 \pm 0,1 \times 10^{11}$

Ao comparar as constantes de supressão, 1k_q , para as diferentes temperaturas, nota-se que, conforme a temperatura é elevada, o valor da constante de supressão diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura, sugerindo a formação de um complexo precursor [rib....vitamina K].

A análise de fluorescência resolvida no tempo também confirmou os resultados acima. A Figura 39 refere-se às medidas de fluorescência resolvida no tempo da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) na presença da vitamina K ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Verifica-se que o tempo de vida para cada solução se mantém constante e praticamente os mesmos quando comparado ao da riboflavina (em torno de $5,50 \pm 0,02$ ns e para vitamina K e para a riboflavina $5,52 \pm 0,02$ ns). Estes dados confirmam que ocorre a formação de um complexo rib-vitamina K no estado fundamental.

Figura 39. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da vitamina K em solução etanol/água 9:1 (v/v) a 25°C.

A formação desse complexo pode ser representada de acordo com a seguinte reação:

O número de moléculas de supressor ligados ao fluoróforo foi calculado através da equação $\log [(I_0 - I) / I] = \log K_a + n \cdot \log [Q]$ e os valores obtidos encontram-se na tabela 12.

A Figura 40 e a tabela 12 mostram as curvas e parâmetros da equação anterior, respectivamente.

Figura 40. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a vitamina K em diferentes temperaturas.

Tabela 12. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a vitamina K, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para as diferentes temperaturas.

T (°C)	K_a (L. mol ⁻¹)	n
35	$5 \pm 2 \times 10^3$	$1,12 \pm 0,01$
30	$2 \pm 1 \times 10^3$	$0,99 \pm 0,02$
25	$1 \pm 1 \times 10^3$	$0,93 \pm 0,01$
20	$6 \pm 1 \times 10^2$	$0,87 \pm 0,02$
15	$2 \pm 1 \times 10^2$	$0,79 \pm 0,03$

Os valores reportados na Tabela 12 demonstram que a formação do complexo precursor riboflavina...vitamina K ocorre com a existência de apenas uma riboflavina por sítio de ligação na vitamina K (independente da temperatura investigada) e a constante de ligação é moderada. O aumento de K_a com o aumento da temperatura sugere um aumento na estabilidade do complexo (99).

Os cálculos referentes aos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo precursor (riboflavina-vitamina K)_n foram realizados com base nos dados coletados na tabela 6 e em acordo com a equação de Van't Hoff. A partir do gráfico da Figura 41, obteve-se os valores de $\Delta H^\circ = -110 \pm 22 \text{ KJ.mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 51 \pm 9 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

Figura 41. Ajuste linear da equação de Van't Hoff.

Estes dados termodinâmicos obtidos demonstram que a reação de complexação entre a riboflavina e a vitamina K é exotérmica, predominantemente por ligação de hidrogênio e com estequiometria 1:1 (100,101,102,103).

A técnica de espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser foi utilizada para verificar a interação da vitamina K com o estado tripleto da riboflavina.

A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem foi calculada através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, $A = A_0 * \exp(-k_{obs}t) + C$ às curvas de decaimento do estado tripleto metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, Figura 42.

Figura 42. Decaimento do estado tripleto excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25°C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm²).

A partir da regressão linear do gráfico de k_{obs} (Figura 43) *versus* a concentração da vitamina K, e de acordo com a equação $k_{obs} = k_0 + k_q[\text{supressor}]$, obteve-se a constante de velocidade de segunda-ordem de reação do estado tripleto da riboflavina de $^3k_q = 1,4 \pm 0,3 \times 10^9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Figura 43. Gráfico de k_{obs} versus [vitamina K] a 25°C.

O valor de 3k_q também está próximo ao do limite de difusão. Verifica-se que a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pela vitamina K com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da riboflavina pelo oxigênio molecular ($9,8 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$, em meio aquoso), também são competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento.

A fim de determinar o mecanismo de degradação predominante para a fotodegradação da vitamina K sensibilizada por flavinas, foram coletados dados referente ao rendimento quântico deste fotoprocessos em condições aeróbicas e anaeróbicas. Desta forma, para se calcular o rendimento quântico utilizou-se o método actinométrico para calcular a intensidade do fluxo da radiação da luminosa. A intensidade calculada foi de $2,2 \times 10^{-8} \text{ Einstein.min}^{-1}$.

Após se determinar o valor da intensidade da luz incidente em função do tempo de irradiação, calculou-se o número de fótons a partir da equação.

Desta maneira, a determinação quantitativa do teor da vitamina K remanescente após a fotólise de uma solução de riboflavina/vitamina K por 180 minutos, com irradiação luminosa em 440 nm, permitiu o cálculo do rendimento quântico de degradação da vitamina K sensibilizados pela flavina e os valores obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Rendimento quântico de degradação da vit K sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O₂.

presença O ₂	ausência O ₂
0,18	0,27
0,18	0,26
0,17	0,27

Ao comparar o rendimento quântico das soluções em condições aeróbicas e anaeróbicas, verifica-se um maior rendimento para a solução anaeróbica. Neste sentido indicando o mecanismo reacional do Tipo I é predominante no processo de degradação da vitamina K.

Com o intuito de se obter 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. O potencial de oxidação obtido de E_{1/2} = 1,4V (NHE) para a Vitamina K (104) e o potencial de redução da riboflavina é de - 0,29V vs NHE (92). Os valores de ΔG° obtidos são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de ΔG° para a reação entre vitamina K com os estados singlete e triplete da riboflavina.

	$\Delta G_{\text{S}} \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_{\text{T}} \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$
Vitamina K	-76,5	-45,3

Os valores negativos de ΔG° indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente tanto para o processo de desativação do estado triplete excitado quanto para o do singlete excitado.

A tentativa de identificação dos principais produtos formados a partir da fotodegradação da vitamina K sensibilizada pela riboflavina foi realizada através análise da solução fotodegradada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo. A Figura 44 ilustra o cromatograma de íon

total obtido para a fotólise da solução de riboflavina/vitamina k irradiada por 180 minutos, com irradiação luminosa em 440 nm.

Figura 44. Cromatograma de íons totais (TIC) da solução fotodegradada da vitamina K-riboflavina irradiada com luz monocromática (440 nm) por 180 minutos, operando no modo negativo por eletrospray.

A análise do pico 1 referente ao cromatograma da Figura 44, o qual apresenta tempo de retenção de $t_r = 5,3$ min, revela a existência do íon pseudo molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 455,09910 \pm 3,8$ ppm indicando um composto de fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_9N_4P^-$ referente a flavina mononucleotídeo (FMN).

A análise pico 2 referente ao cromatograma da Figura 44, o qual apresenta tempo de retenção de $t_r = 5,7$ min, revela a existência do íon pseudo molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 375,133192 \pm 2,4$ ppm indicando um composto de fórmula molecular $C_{17}H_{19}O_6N_4^-$ referente a riboflavina.

A análise pico 3 referente ao cromatograma da Figura 44, o qual apresenta tempo de retenção de $t_r = 13,7$ min, revela a existência do íon pseudo molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 465,33628 \pm 2,4$ ppm atribuído a um composto de fórmula molecular $C_{31}H_{45}O_3^-$ indicando uma possível adição de um átomo de oxigênio na molécula da vitamina K. Isto sugere a formação de um epóxido da vitamina K, o qual encontra-se representado na Figura 45.

Figura 45. Proposta para o fotoproduto gerado pela irradiação da solução vitamina K/rib, epóxido da vitamina K.

A análise pico 4 referente ao cromatograma da Figura 44, o qual apresenta tempo de retenção de $t_r = 15,4$ min, revela a existência do íon pseudo molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 171,04514 \pm 0,1$ ppm o que sugere um composto de fórmula molecular $C_{11}H_7O_2^-$ referente a menadiona (105) Figura 46.

Figura 46. Estrutura química da menadiona.

A análise do pico 5 referente ao cromatograma da Figura 44, o qual apresenta tempo de retenção de $t_r = 25,2$ min, revela a existência do íon pseudo molecular $[M-H]^-$ com $m/z = 449,34155 \pm 2,1$ ppm indicando um composto de fórmula molecular $C_{31}H_{45}O_2^-$ referente a vitamina K.

4.4 Reatividade da coenzima Q10 frente aos estados excitados de flavinas

O espectro eletrônico de absorção da coenzima Q10 encontra-se ilustrado na Figura 47 onde pode-se observar que a CoQ10 não apresenta absorção em comprimento de onda superior a 400 nm e que somente a riboflavina apresenta absorção nesta região e assim não há interferência espectral para a fotoexcitação em 355 nm.

Figura 47. Espectro eletrônico de absorção da CoQ10 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em solução de terc butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25°C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

Na Figura 48 verifica-se o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações da CoQ10 (ambos com as concentrações variando de ausente até a concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹) e em diferentes temperaturas: 15°C, 25°C, 35°C e 45°C. Também se observa que a intensidade de emissão de fluorescência da riboflavina singlete excitada diminui com o aumento da concentração do supressor.

Figura 48. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução terc butanol/água 7:3 (v/v) na presença de concentrações crescentes de CoQ10 (ausente a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e em diferentes temperaturas (15, 25, 35 e 45°C). $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$.

Com os valores coletados de intensidade de fluorescência na ausência do supressor (I_0) e da intensidade de fluorescência na presença de crescentes concentrações analíticas do supressor, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica da coenzima Q10, Figura 49, e calculou o valor da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo supressor através da equação de Stern-Volmer.

Figura 49. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pela coenzima Q10 em diferentes temperaturas.

Os valores da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo supressor encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina pela coenzima Q10 em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	1k_q ($\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
15	$7,4 \pm 0,2 \times 10^{11}$
25	$5,6 \pm 0,1 \times 10^{11}$
35	$4,0 \pm 0,2 \times 10^{11}$
45	$3,4 \pm 0,1 \times 10^{11}$

Verifica-se, ao comparar as constantes de supressão, 1k_q , que conforme a temperatura é elevada, o valor da constante de supressão diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura, sugerindo a formação de um

complexo precursor [rib....CoQ10]. Isto pode ser confirmado através da análise de fluorescência resolvida no tempo.

A Figura 50 refere-se às medidas de fluorescência resolvida no tempo da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) na presença da CoQ10 ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Verifica-se que o tempo de vida para cada solução se manteve constante e praticamente os mesmos quando comparado ao da riboflavina (em torno de $5,15 \pm 0,02$ ns para CoQ10 e para a riboflavina $5,10 \pm 0,02$ ns) o que confirma a formação de um complexo rib-CoQ10 no estado fundamental.

Figura 50. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência da CoQ10 em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v) a temperatura de 25 °C.

A formação desse complexo pode ser representada de acordo com a seguinte reação:

O número de moléculas de supressor ligados ao fluoróforo foi calculado através da equação $\log [(I_0 - I) / I] = \log K_a + n \cdot \log [Q]$ e os valores obtidos encontram-se na tabela 16.

A Figura 51 e a tabela 16 mostram as curvas e parâmetros da equação anterior, respectivamente.

Figura 51. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com a CoQ10 em diferentes temperaturas.

Tabela 16. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e a CoQ10, e razão estequiométrica do número de ligantes por sítio de ligação (n) para as diferentes temperaturas.

T (°C)	K_a (L. mol ⁻¹)	n
45	$9 \pm 2 \times 10^3$	$1,13 \pm 0,01$
35	$4 \pm 1 \times 10^3$	$0,99 \pm 0,02$
25	$4 \pm 1 \times 10^2$	$0,86 \pm 0,01$
15	$1 \pm 1 \times 10^2$	$0,79 \pm 0,03$

Os valores reportados na Tabela 16 demonstram que a formação do complexo precursor riboflavina...CoQ10 ocorre com a existência de apenas uma riboflavina por sítio de ligação na vitamina K independente da temperatura investigada. Verifica-se que K_a aumenta com o aumento da temperatura o que sugere um aumento na estabilidade do complexo (99).

Os cálculos referentes aos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo (riboflavina-CoQ10) $_n$ foram realizados com base nos dados da tabela 16 e em acordo com a equação de Van't Hoff. A partir do gráfico da Figura 52, obteve-se os valores de $\Delta H^\circ = -120 \pm 27$ KJ.mol⁻¹ e $\Delta S^\circ = 41 \pm 7$ J.mol⁻¹.K⁻¹.

Figura 52. Ajuste linear da equação de Van't Hoff.

Os dados termodinâmicos obtidos demonstram que a reação de complexação entre a riboflavina e a CoQ10 é exotérmica, através de interação de hidrogênio e com estequiometria 1:1 (100,101,102,103).

Para verificar a interação da CoQ10 com o estado triplete da riboflavina foi utilizada a técnica de espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser.

A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem foi calculada através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, $A = A_0 * \exp(-k_{obs}t) + C$ às curvas de decaimento do estado triplete metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, Figura 53.

Figura 53. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração do supressor a 25°C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm²).

A partir da regressão linear do gráfico de k_{obs} (Figura 54) *versus* a concentração da CoQ10, e de acordo com a equação $k_{obs} = k_0 + k_q^*[supressor]$, obteve-se a constante de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina de $^3k_q = 7,4 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Figura 54. Gráfico de k_{obs} versus $[\text{CoQ10}]$ a 25°C .

O valor de 3k_q também está próximo ao do limite de difusão. Verifica-se que a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pela CoQ10 com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da riboflavina pelo oxigênio molecular são competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento.

Foram coletados dados referentes ao rendimento quântico de fotodegradação da CoQ10 sensibilizada por flavinas em condições aeróbicas e anaeróbicas com o intuito de determinar o mecanismo de degradação. Desta forma, para se calcular o rendimento quântico utilizou-se o método actinométrico para calcular a intensidade do fluxo da radiação da luminosa. A intensidade calculada foi de $2,4 \times 10^{-8}$ Eistein.min⁻¹

Após se determinar o valor da intensidade da luz incidente em função do tempo de irradiação, calculou-se o número de fótons a partir da equação.

Com a determinação quantitativa do teor da CoQ10 remanescente após a fotólise de uma solução de riboflavina/CoQ10 por 120 minutos, com irradiação luminosa em 440 nm, permitiu o cálculo do rendimento quântico e os valores obtidos encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimento quântico de degradação da CoQ10 sensibilizada pela riboflavina na ausência e presença de O₂.

presença de O ₂	ausência de O ₂
0,23	0,28
0,24	0,29
0,23	0,29

Ao comparar o rendimento quântico das soluções em condições aeróbicas e anaeróbicas, verifica-se um rendimento quântico maior para a solução anaeróbica, indicando que o mecanismo reacional predominante no processo de degradação da CoQ10 é do Tipo I.

O potencial de oxidação obtido de 0,85V (NHE) para a CoQ10 (106). Calculou-se os valores de ΔG° para o processo de transferência de elétrons entre Riboflavina e CoQ10 a partir da equação de Rehm-Weller. Os Valores de ΔG° são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de ΔG° para a reação entre CoQ10 com os estados singlete e triplete da riboflavina.

	$\Delta G_{.S} \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_{.T} \text{ (KJmol}^{-1}\text{)}$
CoQ10	-129,3	-98,2

Os valores negativos de ΔG° obtidos indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente tanto para o processo de desativação do estado triplete excitado quanto para o do singlete excitado.

4.5 Reatividade dos Ésteres de Ácidos Graxos frente aos estados excitados de flavinas

A técnica de fluorescência foi utilizada para verificar a interação dos ésteres de ácidos graxos com o estado singlete da riboflavina. Ao analisar os dados obtidos, verificou-se que a fluorescência da riboflavina na presença de diferentes concentrações de cada um destes ésteres de ácidos graxos não apresentou mudanças permanecendo a mesma, podendo então concluir que nenhum destes ésteres de ácidos graxos foram capazes de suprimir a riboflavina excitada.

A técnica de espectroscopia de absorção eletrônica de transientes por fotólise de pulso de laser foi utilizada para verificar a interação dos ácidos graxos com o estado tripleto da riboflavina.

As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem foram calculadas através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem, às curvas de decaimento do estado tripleto metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, Figura 55, na presença dos ésteres de ácidos graxos: a) EPA e b) CLA.

Figura 55. Decaimento da banda T-T da riboflavina em função da concentração crescente dos supressores a 25°C: a) EPA e b) CLA em solução terc-butanol/água 7:3 (v/v), com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm².

A partir da regressão linear do gráfico de k_{obs} (Figura 56) *versus* a concentração dos ésteres de ácidos graxos, e de acordo com a equação $k_{obs} = k_0 + k_q[\text{supressor}]$, obteve-se as constantes de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina 3k_q e os valores obtidos encontram-se na tabela 19.

Figura 56. Gráfico de k_{obs} versus [ésteres de ácidos graxos] a 25^oC. Tabela 19. Valores das constantes de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina 3k_q . Valores da energia de dissociação da ligação (BDE) C-H para os ésteres de ácidos graxos e o número de hidrogênios bis-álílicos.

Ésteres de ácidos graxos	3k_q	BDE C-H (KJ.mol ⁻¹)	número de H bis-álílicos
oleato de metila	-----	C ₈ -H 331	0
CLA	$3,3 \times 10^7$	C ₈ -H 311	0
linoleato de metila	$8,4 \times 10^5$	C ₁₁ -H 294	1
linolenato de metila	$3,1 \times 10^6$	C ₁₁ -H 293	2
araquidonato de metila (ARA)	$6,2 \times 10^6$	C ₁₀ -H 288	3
eicosapentanoato de metila (EPA)	$7,9 \times 10^6$	C ₁₀ -H 273	4
docosahexanoato de metila (DHA)	$1,2 \times 10^7$	C ₁₀ -H 267	5

Uma vez que a energia de ligação da ligação C-H no grupo metileno é importante para a transferência de átomo de hidrogênio (HAT), obteve-se os valores das energias de dissociação da ligação (BDE), Tabela 19, a fim de se

determinar o mecanismo reacional. Sabe-se que o fator termodinâmico limitante para guiar a HAT é a energia de dissociação (BDE) ser menor que 300 KJ/mol (1). Mediante a comparação da constante de velocidade de segunda ordem para os ácidos graxos insaturados apresentados na Tabela 19 com os valores teóricos calculados BDE, é evidente que a fraca BDE está associada com uma rápida transferência de um átomo de hidrogênio. Para o éster oleato de metila, as ligações C-H são muito fortes e cineticamente desfavorável em comparação com o decaimento natural do estado triplete, e nenhuma reação acontece. Para o éster linoleato de metila, a BDE está abaixo de um limiar crítico para desativação por HAT (300 kJ/mol) e neste caso a HAT ocorre.

As constantes de velocidade aumentam com o aumento dos grupos metileno e parece aproximar-se um limite da velocidade ao diminuir a BDE, como pode ser visto na Figura 57, em que 3K_q depende exponencialmente da BDE para os hidrogênios metilenos.

Figura 57. Constante de velocidade de desativação da riboflavina triplete pelos ésteres de ácidos graxos *versus* BDE.

Ao extrapolar para um valor zero a BDE, é esperado que 3k_q chegue a um limite máximo de $1,22 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para a transferência de átomo de hidrogênio por um ácido graxo hipotético com infinita insaturação.

Note que a constante de velocidade depende linearmente do número de grupos metileno bis-álílico (Figura 58) em vez do valor de BDE como pode ser visto ao comparar as Figuras 57 e 58.

Figura 58. Constante de velocidade de desativação da riboflavina triplete pelos ésteres dos ácidos graxos insaturados *versus* o número de grupos metilênicos bis-alílicos oxidáveis na molécula.

O éster metílico CLA desativa a riboflavina com uma velocidade semelhante a este limite superior, apesar da ausência de grupos metileno bis-alílico e de um BDE elevada (336 kJ.mol^{-1}), que é comparável com o valor para o oleato de metila. Sabe-se que CLA tem um potencial de oxidação de 1,72 V (107) o qual é comparável ao valor de riboflavina triplete, portanto o mecanismo que predomina é o de transferência de elétrons e não o HAT.

4.6. Reatividade da cafeína e seus metabólitos frente aos estados excitados de flavinas

A Figura 59 ilustrado o espectro eletrônico de absorção da cafeína e seus metabólitos (ambos a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). Observa-se também que somente a riboflavina apresenta absorção na região de 440 nm.

Figura 59. Espectro eletrônico de absorção da cafeína e seus metabólitos ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em solução tampão fosfato pH= 6,4 a 25°C. A seta indica o comprimento de onda de excitação utilizada nos experimentos de fotólise por pulso de laser.

A Figura 60 ilustra o espectro de emissão molecular da riboflavina na presença de diferentes concentrações dos metabólitos da cafeína (ambos com as concentrações variando de ausente até a concentração de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes temperaturas 25, 30 e 35°C (somente serão mostrados os espectros de emissão molecular a 25°C). Observa que a intensidade de emissão de fluorescência da riboflavina singlete excitada diminui com o aumento da concentração do supressor. Não houve supressão da fluorescência da riboflavina pela presença de cafeína.

Figura 60. Espectro de emissão de fluorescência da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato pH= 6,4 na presença de concentrações crescentes dos metabólitos da cafeína (de ausente a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) a 25°C . $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 520 \text{ nm}$.

Através dos valores coletados de intensidade de fluorescência na ausência do supressor (I_0) e da intensidade de fluorescência na presença de crescentes concentrações analíticas do supressor, construiu-se o gráfico de I_0/I versus concentração analítica do supressor, Figura 61, (serão apresentados somente os gráficos a 25°C) e através da equação de Stern-Volmer pode-se calcular o valor da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelos supressores.

Figura 61. Gráficos de Stern-Volmer para a supressão da riboflavina pelos metabólitos da cafeína a 25°C.

Sabendo que o tempo de vida, τ_0 , da riboflavina singlete excitada é de 5,75 ns em meio aquoso (62), calculou-se os valores da constante de desativação do estado singlete excitado da riboflavina pelo supressor os quais se encontram na Tabela 20.

Tabela 20. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina para cada metabólito da cafeína.

Metabólitos da cafeína	1k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹) (25°C)	1k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹) (30°C)	1k_q (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹) (35°C)
1,7-dimetilxantina	$3,1 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,9 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^9$
ácido 1,7-dimetil úrico	$1,4 \pm 0,3 \times 10^{10}$	$9,9 \pm 0,1 \times 10^9$	$9,6 \pm 0,2 \times 10^9$
ácido 1-metil úrico	$4,2 \pm 0,2 \times 10^9$	$4,1 \pm 0,2 \times 10^9$	$3,9 \pm 0,1 \times 10^9$
cafeína	não reagiu	não reagiu	não reagiu

Os valores da constante de supressão estão no limite de difusão. Ao comparar as constantes de supressão, 1k_q , para as diferentes temperaturas, nota-se que, conforme a temperatura é elevada, o valor da constante de supressão diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura, sugerindo a formação de um complexo precursor [rib....metabólito da cafeína].

A análise de fluorescência resolvida no tempo também confirmou os resultados acima. A Figura 62 refere-se às medidas de fluorescência resolvida no tempo da riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) na presença da cafeína e seus metabólitos ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹). Verifica-se que o tempo de vida para cada solução se mantém constante e praticamente os mesmos quando comparado ao da riboflavina, como pode ser visto na tabela 21. Estes dados confirmam que ocorre a formação do complexo riboflavina com cada metabólito da cafeína no estado fundamental.

Figura 62. Decaimento de fluorescência da riboflavina na presença e ausência de cada metabólito da cafeína em tampão fosfato pH=6,4 a 25°C.

Tabela 21. Tempo de vida calculado por fluorescência resolvida no tempo para a riboflavina e metabólitos da cafeína.

Metabólitos da cafeína	tempo de vida (ns)
riboflavina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹)	$4,52 \pm 0,01$
1,7-dimetilxantina ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹)	$4,50 \pm 0,01$
1,7-dimetilxantina ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹)	$4,51 \pm 0,01$
ácido 1,7-dimetil úrico ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹)	$4,49 \pm 0,01$
ácido 1,7-dimetil úrico ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹)	$4,51 \pm 0,01$
ácido 1-metil úrico ($1,0 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹)	$4,50 \pm 0,01$
ácido 1-metil úrico ($1,0 \times 10^{-4}$ mol.L ⁻¹)	$4,51 \pm 0,01$

A formação desse complexo pode ser representada de acordo com a seguinte reação:

O número de moléculas de supressor ligadas ao fluoróforo foi calculado através da equação $\log [(I_0 - I) / I] = \log K_a + n \cdot \log [Q]$ e os valores obtidos encontram-se na tabela 22.

A Figura 63 e a tabela 22 mostram as curvas e parâmetros da equação anterior, respectivamente, feitos a 25°C, 30°C e 35°C (só ilustraremos a 25°C).

Figura 63. Linearização da equação de Stern-Volmer para cálculo da constante de associação (K_a) e número de sítios de ligação (n) para a complexação da riboflavina com os metabólitos da cafeína em diferentes temperaturas.

Tabela 22. Valores das constantes de associação (K_a) entre a riboflavina e os metabólitos da cafeína, e razão estequiométrica do número de ligantes (n) por sítio de ligação para as diferentes temperaturas.

Metabólitos da cafeína	T (°C)	K_a (L.mol ⁻¹)	n
1,7-dimetilxantina	35	339 ± 2	1,06 ± 0,01
1,7-dimetilxantina	30	301 ± 1	0,97 ± 0,01
1,7-dimetilxantina	25	275 ± 1	0,94 ± 0,02
ácido 1,7-dimetil úrico	35	485 ± 2	1,12 ± 0,01
ácido 1,7-dimetil úrico	30	366 ± 3	0,97 ± 0,02
ácido 1,7-dimetil úrico	25	295 ± 1	0,92 ± 0,01
ácido 1-metil úrico	35	427 ± 3	1,11 ± 0,01
ácido 1-metil úrico	30	324 ± 1	0,99 ± 0,01
ácido 1-metil úrico	25	289 ± 1	0,89 ± 0,02

Os valores reportados na Tabela 22 demonstram que a formação do complexo precursor riboflavina...metabólito da cafeína ocorre com a existência de apenas uma riboflavina por sítio de ligação nos derivados da cafeína independente da temperatura investigada. O aumento de K_a com o aumento da temperatura sugere um aumento na estabilidade do complexo (99).

Os cálculos referentes aos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo (riboflavina- metabólito da cafeína)n foram realizados com base nos dados da tabela 22 e em acordo com a equação de Van't Hoff. A partir do gráfico da Figura 64, obteve-se os valores de ΔH° e ΔS° os quais podem ser vistos na tabela 23.

Figura 64. Ajuste linear da equação de Van't Hoff.

Tabela 23. Valores de ΔH^0 e ΔS^0 para cada metabólito da cafeína calculados pela equação de Van't Hoff.

Metabólitos da cafeína	ΔH^0 (J.mol ⁻¹ . K ⁻¹)	ΔS^0 (KJ.mol ⁻¹)
1,7-dimetilxantina	-16 ± 3	6 ± 1
ácido 1,7-dimetil úrico	-45 ± 8	12 ± 1
ácido 1-metil úrico	-38 ± 5	9 ± 2

Estes dados termodinâmicos obtidos demonstram que a reação de complexação entre a riboflavina e os metabólitos da cafeína é exotérmica, por ligação de hidrogênio e com estequiometria 1:1. O valor ligeiramente positivo de ΔS^0 sugere que a água está sendo liberada do complexo (100,101,102,103).

A desativação do estado excitado tripleto da riboflavina pelos metabólitos da cafeína foi investigada por espectroscopia de absorção

eletrônica de transientes por fotólise por pulso de laser. A constante de velocidade de pseudo-primeira ordem foi calculada através do ajuste de uma equação de decaimento exponencial de primeira ordem às curvas de decaimento do estado triplete metaestável da riboflavina monitoradas a 720 nm, Figura 65.

Figura 65. Decaimento do estado triplete excitado da riboflavina em função da concentração dos metabólitos da cafeína, preparados em tampão fosfato pH=6,4 a 25°C (pulso de laser de 355 nm com duração de 8 ns e potência de 10 mJ.cm²).

Pela análise do gráfico das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem *versus* à concentração do supressor, Figura 66, foi possível calcular as constantes de velocidade específica para a desativação através do coeficiente angular obtido da linearização do gráfico: $k_{obs} = k_0 + k_q \cdot [\text{supressor}]$. Obteve-se a constante de velocidade de segunda-ordem de reação do estado triplete da riboflavina que encontram na tabela 24.

Figura 66. Gráfico de k_{obs} versus [metabólitos da cafeína] a 25°C.

Tabela 24. Valores das constantes de supressão bimolecular do estado singlete da riboflavina para cada metabólitos da cafeína.

Metabólitos da cafeína	3k_q
1,7-dimetilxantina	$4,2 \pm 0,3 \times 10^7$
ácido 1,7-dimetil úrico	$1,0 \pm 0,5 \times 10^8$
ácido 1-metil úrico	$1,4 \pm 0,4 \times 10^8$
cafeína	não reagiu

Os valores de 3k_q também estão próximo ao do limite da difusão. Verifica-se que a constante de desativação da riboflavina triplete excitada pelos metabólitos da cafeína com a constante de velocidade de desativação do estado triplete excitado da riboflavina pelo oxigênio molecular também são

competitivos e a preferência cinética de um a outro depende da matriz alimento. A cafeína não reagiu com o estado triplete da riboflavina.

Com o intuito de se verificar o potencial de oxidação dos metabólitos da cafeína, foram realizados experimentos de voltametria cíclica. A janela de potencial utilizada foi de 0,0 a 2,2 V usando o eletrodo Ag/AgCl como referência. Os voltamogramas podem ser observados na Figura 67.

Figura 67. Voltamogramas cíclicos dos metabólitos da cafeína a 25⁰C: (A) cafeína (B) ácido 1-metil urico (C) ácido 1,7-dimetil urico (D) 1,7-dimetilxantina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato pH=6,4 contendo 50 mmol.L^{-1} de hexafluorofosfato de tetra-n-butilamônio, utilizando os seguintes eletrodos: Ag/AgCl (referência), carbono vítreo (trabalho) e de platina (contra-eletrodo). A velocidade de varredura utilizada foi de 100 mV.s^{-1} .

Os potenciais de oxidação obtidos através da voltametria cíclica encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25. Potenciais de oxidação da cafeína e seus metabólitos.

Metabólitos da cafeína	$E_{1/2}$ (NHE)
1,7dimetilxantina	1,2 V
ácido1,7-dimetil úrico	0,9 V
ácido 1-metil úrico	0,6 V
cafeína	1,7 V

Com o intuito de obter informações sobre a transferência de elétrons procurou-se obter dados termodinâmicos de cada sistema riboflavina/metabólitos da cafeína. A diferença de energia livre padrão de Gibbs, ΔG° , calculou-se os valores de ΔG° para o processo de transferência de a partir da equação de Rehm-Weller. Os Valores de ΔG° são mostrados na Tabela 26.

Tabela 26. Valores de ΔG° para a reação entre cafeína e seus metabólitos com os estados singlete e triplete da riboflavina.

	ΔG_s (KJmol ⁻¹)	ΔG_T (KJmol ⁻¹)
1,7-dimetilxantina	-95,5	-63,5
ácido1,7-dimetil úrico	-124,5	-89,5
ácido1-metil úrico	-153,4	-124,3
cafeína	-47,3	-16,2

Os valores negativos de ΔG° obtidos indicam que a reação de transferência de elétrons pode ocorrer espontaneamente tanto para o processo de desativação do estado triplete excitado quanto para o do singlete excitado.

5. Conclusão

As reações fotosensibilizadas por flavinas sabidamente apresentam importância prática na estabilidade e na qualidade de diversos alimentos ricos em vitamina B₂ quando expostos a radiação luminosa (1). Os produtos lácteos, ricos ou enriquecidos com lipídeos tais como queijos, manteigas, requeijão e queijos processados podem apresentar preocupação adicional devido ao maior tempo de prateleira e a exposição à radiação luminosa na região do azul em virtude do uso de embalagens transparentes. Neste contexto, com base nas constantes de velocidades específicas para a reação entre o colesterol, ergosterol, vitamina K, coenzima Q10, vitamina D com o estado triplete de flavinas aqui reportadas como próximas ao limite de difusão, fica claro a importância da fotooxidação do tipo I sensibilizada por flavinas para estes micronutrientes nestes alimentos. Podemos aqui mencionar a oxidação do colesterol e de fitoesteróis promovendo a formação de seus respectivos óxidos em, por exemplo, manteiga, margarina e requeijão os quais são potencialmente tóxicos a saúde humana e provavelmente são gerados por reação fotosensibilizada pela riboflavina. Também podemos mencionar nesse ínterim a fotoisomerização da vitamina D sensibilizada pela riboflavina gerando a espécie 5,6-*trans*-vitamina D ocasionado a perda de valor nutricional em produtos lácteos expostos a radiação luminosa na região do visível.

Com relação à saúde humana, tanto a pele quanto os olhos são expostos constantemente a radiação luminosa no UV-A e UV-B e ambos os órgãos contem quantidades significativas de flavinas, sendo estes sensíveis a reações fotosensibilizadas envolvendo proteínas, lipídeos e estruturas sensíveis. Neste caso, observa-se claramente pelos dados cinéticos aqui reportados o papel funcional do consumo de gorduras poliinsaturadas como as gorduras de óleo de peixe (DHA e EPA) bem como a manutenção dos níveis adequados de vitamina D no organismo na fotoproteção da pele e da visão frente a exposição a radiação luminosa no UV-A e UV-B promovendo reações de fotooxidação sensibilizada por flavinas de proteínas e estruturas sensíveis ocasionado doenças degenerativas tais como o câncer, degeneração macular e catarata. Ainda na saúde de olhos e pele, os dados cinéticos de desativação do estado triplete de flavinas por metabólitos da cafeína sugerem que o

mecanismo por traz do efeito benéfico do consumo regular de bebidas ricas em cafeína frente à incidência de melanoma e desenvolvimento de catarata está vinculada a desativação do estado triplete excitado das flavinas por metabólitos de fase I da cafeína, protegendo estruturas sensíveis da fotooxidação sensibilizada por flavinas (8,9,10,87,88,89).

6-Referência Bibliográfica

- 1- CARDOSO, D.R.; LIBARDI, S.H.; SKIBSTED, L.H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. **Food Function**, v. 3, n. 5, p. 487-502, 2012.
- 2-CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais usados nas formulações brasileiras. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 3, 2011.
- 3- CHO, E.; HUNG, S.; WILLETT, W. C.; SPIEGELMAN, D.; RIMM, E. M.; SEDDON, J. M.; COLDITZ, G. A.; HANKINSON, S. E. Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 209-218, 2001.
- 4-SZODORAY, P.; NAKKEN, B.; GAAL, J.; JONSSON, R.; SZEGEDI, A.; ZOLD, E. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 3, p. 261-269, 2008.
- 5- SEDDON, J. A. Multivitamin-multimineral supplements and eye disease: age-related macular degeneration and cataract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 304-307, 2007.
- 6- CARDOSO, D. R.; SCURACHIO, R. S.; SANTOS, W. G.; SKIBSTED, L. H. Riboflavin-photosensitized oxidation is enhanced by conjugation in unsaturated lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2268-2275, 2013.
- 7-MANCIO, M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 145-153, 2011.
- 8-SONG, F.; QURESHI, A.; HA, J. Increased caffeine intake is associated with reduced risk of basal cell carcinoma of the skin. **Cancer Research**, v. 72, p. 3282-3289, 2012.
- 9- LOFTFIELD, E.; FREEDMAN, N. D.; GRAMBARD, B. L.; HOLLENBECK, A. R.; SHEBL, F. M.; MAYNE, T. S.; SINHA, R. Coffee Drinking and cutaneous melanoma risk in the NIH-AARP diet and health study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, p. 1-9, 2015.
- 10- VARMA, S. D.; KOVTUN, S.; HEGDE, K. Effectiveness of topical caffeine in cataract prevention: studies with galactose cataract. **Molecular Vision**, v. 16, p. 2626-2633, 2010.
- 11-ALBERT, L. **Bioquímica: componentes moleculares das células**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. 200 p.

- 12- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fenema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 903 p.
- 13-SCHAEFFER, A.; BOUVIER-NAVE, P.; BENVENISTE, P.; SCHALLER, H. Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2. **Lipids**, v. 35, p. 263-269, 2000.
- 14-SCHALLER, H. The role of sterols in plant growth and development. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 163-175, 2003.
- 15-LAGARDA, M. J.; GARCIA-LLATAS, G.; FARRE, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1486-1496, 2006.
- 16-HARPER, H. A.; RODWELL, W. M.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. São Paulo: Atheneu, 1982. 736 p.
- 17-MAERKER, G. Cholesterol autoxidation-current status. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 64, n. 3, p. 388-92, 1987.
- 18-FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 369-388, 1992.
- 19-LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 599-607, 2009.
- 20-DVORKIN, V. I.; NARINOVA, I. N. Methods of determining cholesterol. **Journal of Analytical Chemistry of the USSR**, v. 45, n. 4, p. 837-857, 1990.
- 21- CAULA , F. C. B.; OLIVEIRA, M. P.; MAIA , E. L. Teor de colesterol e composição centesimal de algumas espécies de peixes do estado do Ceará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 959-963, 2008.
- 22-SMITH, L. L. Cholesterol autooxidation. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 44, p. 87-125, 1987.
- 23-VILLARES, A.; GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; RAMOS, A. Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26 p. 177-182, 2012.
- 24-ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 439, 2013.
- 25-CHIOCCHIO, V. M.; MATKOVIC, L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. a modified technique. **The Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 98, p. 10-15, 2011.

26-PETERS, B, S, E. **Vitamina D em adolescentes: ingestão, nível sérico e associação com adiposidade e pressão arterial**. 2009.131 f. Tese (Doutorado em Nutrição). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

27-MARQUES, C. D. L.; DANTAS, A. T.; FRAGOSO, T. S.; DUARTE, A. L. B. P. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67-79, 2010.

28-PARISH, D.B. Determination of vitamin D in foods: A Review. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 29-57, 1979.

29-BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. The importance for growth of dietary intake of calcium and vitamin D. **Jornal de Pediatria** , v. 84 , n. 5, p. 386-394, 2008.

30-BRINGHURST, F. R.; DEMAY, M. B.; KRONENBERG, H. M. Hormones and disorders of mineral metabolism. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R. **Textbook of Endocrinology**, 11 ed. Philadelphia: Elsevier, 2008 p.

31-KALAC, P. Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. **Journal Agrobiology**, v. 29, n. 1, p. 1–13, 2012.

32- CRANE, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 591–598, 2001.

33- STRAZIKAR, M.; FIR, M.; GOLC-WONDRA, A.; MILIVOJEVIC, L.; PROSEK, M.; ABRAM, V. Quantitative determination of coenzyme Q10 by liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in dairy products. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1020-1027, 2005.

34-KUMAR, A.; KAUR, H.; DEVI, P.; MOHAN, V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 124, p. 259-268, 2009.

35- PEPE, S.; MARASCO, S.; HAAS, S.; SHEERAN, F.; KRUM, H.; ROSENFELDT, F. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. **Mitochondrion**, v. 7, p. S154-S167, 2007.

36-SHINDO, T.; WITT, E.; HAN, D.; EPSTEIN, W.; PARCKER, L. Enzymic and nonenzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 122-124, 1994.

37- CENDELLA, R. J.; NEELY, A. R.; SEXTON, P. Concentration and distribution of ubiquinone (coenzyme Q), the endogenous lipid antioxidant, in the rat lens: effect of treatment with simvastatin. **Molecular Vision**, v. 11, p. 594-602, 2005.

- 38-KITANO, M.; HOSOE, K.; FUKUTOMI, N.; HIDAKA, T.; OHTA, R.; YAMAKAGE, K.; HARA, T. Evaluation of the mutagenic potential of ubidecarenone using three short-term assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 365-370, 2006.
- 39-ALLEMAN, I. B.; BAUMANN, L. Antioxidants used in skin care formulations. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 7, p. 5-9, 2008.
- 40-FORMARK-ANDREÉ, P.; DALLNER, G.; ERNEST, L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 6, p. 749-757, 1995.
- 41-KIM, J. M.; PARK, E. Coenzyme Q10 attenuated DMH induced pre-cancerous lesions in SD rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, n. 56, n. 2, p. 139-144, 2010.
- 42-BAHAR, M.; KHAGHANI, S.; PASALAR, S.; PAKNEJAD, M.; KHORRAMIZADEH, M. R.; MIRMIRANPOUR, H.; NEJAD, S. G. Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. **Nutrition Journal**, v. 62, n. 9, p. 2-8, 2010.
- 43-OVERVAD, K.; DIAMANT, B.; HOLM, L.; HOLMER, L.; MORTENSEN, S. A.; STENDER, S. Review coenzyme Q10 in health and disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 764-770, 1999.
- 44- DORES, S. M. C.; PAIVA, S. A. R.; CAMPANA, A. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, v.14, p. 207-218, 2001.
- 45-RUCKER, R. B. Improved functional endpoints for use in vitamin K assessment: important implications for bone disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 883-884, 1997.
- 46- MAHAN, K. L.; STUMP-SCOTT, S. K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11.ed. São Paulo: Roca, 2005. 1227 p.
- 47- DAMON, M.; ZHANG N.Z.; HAYTOWITZ D.B.; BOOTH, S. L. Plylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 751-758, 2005.
- 48- OTTAWAY, P. B. **The nutrition handbook for food processors**. Abington: Woodhead, 2002. 483 p.
- 49- COMBS, G. F. **The vitamins**. San Diego: Academic Press, 2008. 603 p.
- 50- MOURÃO, D. M.; SALES, N. S.; COELHO, S. B.; SANTANA, H. M. P. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 529-539, 2005.

- 51- SUTTIE, S. W. Vitamin K and human nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 92, n. 5, p. 585-590, 1992.
- 52- SHILS, E. M.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. Barueri: Manole, 2003. 89 p.
- 53- RUTTY, G. N.; SMITH, C. M.; MALIA, R. G. Late form hemorrhagic disease of the newborn: a fatal case report with illustration of investigations that may assist in avoiding the mistaken diagnosis of child abuse. **American Journal of Forensic Medicine & Pathology**, v. 20, n. 1, p. 48-51, 1999.
- 54- KLACK, K.; CARVALHO, J. F. Vitamina K: metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 6, p. 398-406, 2006.
- 55- 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.
- 56-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.
- 57-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.
- 58-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.
- 59-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.
- 60-FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 496 p.
- 61-FUH, R. A. **Molar extinction of riboflavin**. 1997. Disponível em: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/abs_html/riboflavin.html>. Acesso em: 06 jan. 2014.
- 62-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.

63-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.

64-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.

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

66-SIDDIQUI, R. A.; HARVERY, K. A.; ZALOGA, G. P. Modulation of lipid rafts by omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutritional support. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, p. 74-88, 2007.

67- HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty acids and cancer therapy. **Jornal de Nutrição**, v. 134, p. 3427-3430, 2004.

68-WEISMANN, D.; HARTVIGSEN, K.; LAUER, N.; BENNETT, K. L.; SCHOLL, H. P. N.; ISSA, P. C.; CANO, M.; BRANDSTATTER, H.; TSIMIKAS, S.; SKERKA, C.; SUPERTI-FURGA, G.; HANDA, J. T.; ZIPFEL, H. P. F.; WITZTUM, J. L.; BINDER, C. J. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. **Nature**, v. 478, p. 76-81, 2011.

69-CHIU, C. J.; HUBBARD, L. D.; ARMSTRONG, J.; ROGERS, G.; JACQUES, P. F.; CHYLACK, L. T. J.; HANKINSON, S. E.; WILLETT, W. C.; TAYLOR, A. Dietary glycemic index and carbohydrate in relation to early age-related macular degeneration. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 4, p. 880-886, 2006.

70- VISENTAINES, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

71-HONG, S.; KIM, J. Y.; CHO, S. Y.; PARK, H. J. The effect of gamma irradiation on oleic acid in methyl oleate and food. **Food Chemistry**, v. 121, p. 93–97, 2010.

72-SJAAK, K.; MEER, B. V.; ALKEMA, G.; JANSSEN, H.; BRINKMAN, U. A. T. Automated determination of fatty acid methyl ester and *cis/trans* methyl ester composition of fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 391–397, 2001.

73-U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food additives permitted in feed and drinking water of animals**. 2014. Disponível em: <
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.640>> Acesso em: 18 mar. 2015.

- 74- LORES, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; PÉREZ-DÍAZ, D.; DOMÍNGUEZ, J. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 2993–2996, 2006.
- 75- RHODES, L. E.; O'FARRELL, S.; JACKSON, M. J.; FRIEDMANN, P. S. Dietary fish-oil supplementation in humans reduces UVB-erythral sensitivity but increases epidermal lipid peroxidation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, p. 151–154, 1994.
- 76- MUKERJEE, P. K.; MARCHESELLI, V. L.; SERHAN, C. N.; BAZAN, N. G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 22, p. 8491–8496, 2004.
- 77- BOESLMA, E.; HENDRIKS, H. F. J.; ROZA, L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 853–864, 2001.
- 78-HECKMAN, M. A.; JWEIL, J.; MEJIA, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.
- 79-BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes - uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.
- 80- JAMES, J. E. **Caffeine and health**. London: Academic Press, 1991. 432 p.
- 81- MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.
- 82-ALTIMARI, L. R.; MORAES, A. C.; TIRAPEGUI, J.; MOREAU, R. L. M. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 17-27, 2006.
- 83-NOWELL, S.; SWEENEY, C.; HAMMONS, G.; KADLUBAR, F. F.; LANG, N. P. CYP2A6 activity determined by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 377–383, 2002.
- 84-MATTSON, M. P.; MUGHAL, M. R.; CHAN, S. L.; BAHARANI, A.; TANG, S.; YU, Q.; HOLLOWAY, H. W.; WHEELER, R.; POOSALA, S.; GREIG, N. H.; MATSSON, G. M. P. A synthetic uric acid analog accelerates cutaneous wound healing in mice. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. 1-10, 2010.

- 85- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA). **Tipos de câncer**. 2010. Disponível em:
<www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definição> Acesso em:12 maio 2015.
- 86- HAN, W.; MING, M.; HE, Y. Y. Caffeine promotes ultraviolet B-induced apoptosis in human keratinocytes without complete DNA repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 22825–22832, 2011.
- 87- CONNEY, A. H.; ZHOU, S.; LEE, M.; XIE, J. G.; YANG, C. S.; LOU, Y. R.; LU, Y. Stimulatory effect of oral administration of tea, coffee or caffeine on UVB-induced apoptosis in the epidermis of SKH-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 209 – 213, 2007.
- 88- DELAHUNTY, T.; SCHOENDORFER, D. Caffeine demethylation monitoring using transdermal sweat patch. **Journal Analytical Toxicology**, v. 22, p. 596-600, 1998.
- 89- KRONSCHLÄGER, M.; LÖFGREN, S.; TALEBIZADEH, N.; VARMA, S. D.; SÖDERBERG, P. Caffeine eye drops protect against UV-B cataract. **Experimental Eye Research**, v. 113, p. 26-31, 2013.
- 90- SIMONI, D. A.; 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.
- 91- 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.
- 92- FARID, S.; DINNOCENZO, J. P.; MERKEL, P. B.; YOUNG, R. B.; SHUKLA, D. Reexamination of the rhem-weller data set electron transfer quenching that follows a Sandros-Boltzmann dependence free. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 30, p. 11580-11587, 2011.
- 93- 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.
- 94- KAMAT, B. P.; SEETHARAMAPPA, J.; MELWANKI, M. B. Spectroscopic studies on the interaction of riboflavin with bovine serum albumin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 173-178, 2004.
- 95- GRIPPA, J. M.; ZAWADZKI, A.; GROSSI, A. B.; SKIBSTED, L. H.; CARDOSO, D. R. Riboflavin photosensitized oxidation of mioglobin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1153-1158, 2014.

- 96- OKAMURA, W. H.; HAMMOND, M. L.; REGO, A.; NORMAN, A. W.; WING, R. M. Studies on vitamin D (calciferol) and its analogues 12. Structural and synthetic studies of 5,6-dihydrovitamin D₃ and the stereoisomers of 10,19-dihydrovitamin D₃ including dihydrotachysterol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, p. 2284-2291, 1997.
- 97-YAMADA, S.; NAKAYAMA, K.; TAKAYAMA, H. Studies of vitamin D oxidation. Dye-sensitized photooxidation of vitamin D and chemical behavior of vitamin D 6,19-epidioxides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 3477-3483, 1983.
- 98- GIELEN, J. W. J.; KOOLSTRA, R. B.; JACOBS, H. J. C.; HAVINGA, E. Triplet-sensitized interconversion and photooxidation of vitamin D and trans-vitamin D. **Journal of the Royal Netherlands Chemical Society**, v. 99, p. 306-311, 1980.
- 99- BRIGGS, M. H.; CHRISTIE, G. A. **Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology**. London: Academic Press Inc, 1974. 145 p.
- 100-LOUN, B.; HAGE, D. S. Chiral separation mechanisms in protein-based HPLC columns. Thermodynamic studies of (*R*)- and (*S*)-warfarin binding to immobilized human serum albumin. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 3814-3822, 1994.
- 101-MORE, V. R.; MOTE, U. S.; PATIL, S. R.; KOLEKAR, G. B. Fluorescence quenching studies of the interaction between riboflavin and norfloxacin and analytical application in the determination of vitamin B₂. **Journal of Solution Chemistry**, v. 39, p. 97-106, 2010.
- 102-MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.
- 103- TANWIR, A.; JAHAN, R.; QUADIR, M. A.; KAISAR, M. A.; HOSSAIN, M. K. Spectroscopic studies of the interaction between metformin hydrochloride and bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 45-49, 2012.
- 104-WEBSTER, R. D. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. **The Chemical Record**, v. 12, p. 188-200, 2012.
- 105-MARI, S. D. J.; SUPPLE, J. H.; RAPOPORT, H. Mass spectra of naphthoquinones. Vitamin K₁. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 6, p. 1226-1232, 1966.
- 106-LITESCU, S. C.; DAVID, I.; RADU, G.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ at a solid glass carbon electrode. **Instrumentation Science & Technology**, v. 29, n. 2, p. 109-116, 2001.

107-BALTES, H.; STECKHAN, E.; SCHAFER, H. J. . Anodic-oxidation of organic compounds. 21. Anodic-oxidation of conjugated dienes. **Chemische Berichte Recueil**, v. 111, p. 1294–1314, 1978.