

LILIAN KELLY DOS SANTOS ROMANHOLI

**ESTUDOS DAS PROPRIEDADES DOS COMPLEXOS DE ÁCIDO
HIALURÔNICO COM OS ÍONS METÁLICOS Cu^{+2} , Zn^{+2} E Gd^{+3}**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e
Ciências dos Materiais, ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia - PIPE - UFPR.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lucia Ramalho Mercê

CURITIBA

2005

LILIAN KELLY DOS SANTOS ROMANHOLI

ESTUDOS DAS PROPRIEDADES DOS COMPLEXOS DE ÁCIDO HIALURÔNICO
COM OS ÍONS METÁLICOS Cu^{+2} , Zn^{+2} E Gd^{+3}

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lucia Ramalho Mercê



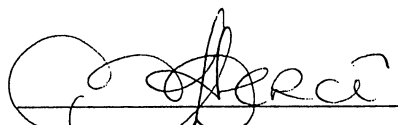
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia - PIPE
Setor de Tecnologia

RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

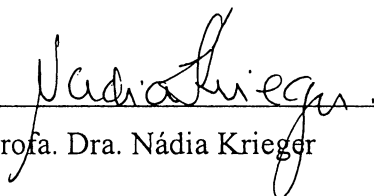
Aos quatorze dias do mês de abril de 2005, no Auditório do Departamento de Química no Centro Politécnico - UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Fernando Wypych, coordenador do PIPE – Programa de Pós-Graduação em Engenharia, a Banca Examinadora para a Octogésima quinta defesa de mestrado na área de concentração: Engenharia e Ciências de Materiais. Estiveram presentes no Ato, além do coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia, foi constituída pelos professores doutores Judith Felcman (PUC-RJ), Nadia Krieger (UFPR) e Ana Lucia R. Mercê (UFPR). Às 10:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Lilian Kelly dos Santos Romanholi** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “**Estudos das propriedades dos complexos metálicos de ácido hialurônico com os íons metálicos Cu(II), Zn(II) e Gd(III)**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decide pela APROVAÇÃO do candidato, (de acordo com a determinação dos Artigos 62 e 63 da Resolução 62/03 de 22.07.03).

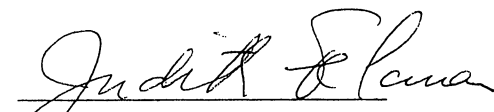
Curitiba, 14 de abril de 2005.



Profa. Dra. Ana Lucia R. Mercê



Profa. Dra. Nádia Krieger



Profa. Dra. Judith Felcman

Agradecimentos

À UFPR, que através do PIPE forneceu a oportunidade de estar realizando este trabalho.

A Deus, pela vida, pela força e pela oportunidade de estar realizando este trabalho em um país com tanta desigualdade social, onde a minoria da população jovem tem acesso à formação acadêmica.

Aos meus pais pelo incentivo, por acreditarem e confiarem em mim no momento mais decisivo da minha vida e a compreensão de minha ausência ao lado deles tão cedo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lucia Ramalho Mercê, pela oportunidade, paciência, compreensão, dedicação e principalmente pela amizade e o carinho conquistado durante este período.

A todos os meus amigos, Solange, Alessandra, Valéria, Guimarães e Dudu, que de formas diretas ou indiretas me auxiliaram nos momentos necessários e em especial, a Ariane pela ajuda direta no trabalho e pelo apoio emocional em momentos difíceis.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial, Paulo Henrique e Ana Paula que me ajudaram quando precisei.

Ao professor Dusan Bakos por ter fornecido o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Maria Àngeles Lobo Recio, pela oportunidade de ter iniciado este trabalho quando ainda estava na graduação.

E a mim mesma.

“É tão estranho quando fecho os olhos, não sei se gostaria que o tempo fosse mais rápido ou se ao menos os dias fossem passando um após o outro. Mas é claro que o sol vai voltar a brilhar mais uma vez, eu acredito que aonde existe esperança, existe também magia, a arte da criação e a alegria de cada dia estarmos prontos para todas as dificuldades que possam aparecer.

O que nos mantém vivos é a imaginação presente em nossos pensamentos, quando em poucos segundos podemos estar em vários lugares, com várias pessoas que de uma forma ou de outra fazem ou fizeram parte de nossas vidas. Algumas pessoas vêm e passam por nossas vidas como uma fraca brisa de outono, outras causam uma tempestade que deixa marcas profundas, e há também as que chegam devagar como uma fraca garoa, que aos poucos vai diminuindo até cessar, revelando um belo arco-íris e logo em seguida, um sol radiante, com um calor envolvente e aconchegante.

Porém, estas pessoas não são tão fáceis de serem encontradas, pois o encontro não depende só delas, depende também de quem está encontrando estas pessoas. Quando existe afinidade, encanto e magia entre duas pessoas, de uma maneira ou de outra isso será manifestado, é como se já estivesse escrito, e com certeza será uma experiência única para ambas.

Não existe ninguém igual a ninguém, as diferenças é que são responsáveis por grandes encontros ou até mesmos desencontros. O julgamento por pensamentos e atitudes diferentes pode ser substituído por observação e aprendizado, sempre é possível aprender algo, depende da maneira pela qual ações e pensamentos são analisados. O que faz a grande diferença entre os seres humanos é simplesmente serem diferentes”.

Lilian Kelly dos S. Romanholi

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido hialurônico.....	12
Figura 2. Sistema de titulação.....	23
Figura 3. Titulação potenciométrica Hial: cobre.....	28
Figura 4. Titulação potenciométrica Hial: zinco.....	29
Figura 5. Titulação potenciométrica Hial: gadolínio.....	31
Figura 6. Diagrama de distribuição Hial: cobre.....	34
Figura 7. Diagrama de distribuição Hial: zinco.....	35
Figura 8. Diagrama de distribuição Hial: gadolínio.....	36
Figura 9. Espectros de Ultravioleta do ácido hialurônico 190-390 nm.....	38
Figura 10. Espectros de Ultravioleta do ácido hialurônico 190-330 nm.....	39
Figura 11. Espectros de Ultravioleta do metal cobre 190-390 nm.....	41
Figura 12. Espectros de Ultravioleta do metal cobre 190-330 nm.....	42
Figura 13. Espectros de Ultravioleta Hial: cobre 190-390 nm.....	43
Figura 14. Espectros de Ultravioleta Hial: cobre 190-330 nm.....	44
Figura 15. Pontos isobstéticos do sistema Hial: cobre.....	45
Figura 16. Espectros de Ultravioleta do metal zinco 190-390 nm.....	46
Figura 17. Espectros de Ultravioleta do metal zinco 190-330 nm.....	47
Figura 18. Espectros de Ultravioleta Hial: zinco 190-390 nm.....	48
Figura 19. Pontos isobstéticos do sistema Hial: zinco.....	49
Figura 20. Espectros de Ultravioleta do metal gadolínio 190-390 nm.....	50
Figura 21. Espectros de Ultravioleta do metal gadolínio 220-330 nm.....	51
Figura 22. Espectros de Ultravioleta Hial: gadolínio 190-390 nm.....	51
Figura 23. Espectros de Ultravioleta Hial: gadolínio 220-330 nm.....	52
Figura 24. Pontos isobstéticos do sistema Hial: gadolínio.....	53
Figura 25. Espectros de Infravermelho Hial: cobre pH 5,00 a 8,00.....	55
Figura 26. Espectros de Infravermelho Hial: cobre pH 5,94 e 7,34.....	55
Figura 27. Espectros de Infravermelho Hial: zinco pH 6,00 a 8,00.....	57
Figura 28. Espectros de Infravermelho Hial: zinco pH 7,02 e 8,00.....	58
Figura 29. Espectros de Infravermelho Hial: gadolínio pH 5,00 a 9,00.....	59

Figura 30. Espectros de Infravermelho Hial: gadolínio pH 6,10 a 8,90.....	60
Figura 31. Estrutura proposta do complexo Hial: cobre.....	62
Figura 32. Estrutura proposta do complexo Hial: zinco.....	63
Figura 33. Estrutura proposta do complexo Hial: gadolínio.....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Íons Metálicos	13
Cobre (Cu^{+2})	14
Zinco (Zn^{+2})	14
Gadolínio (Gd^{+3})	15
1.2. Técnicas de Análise	16
1.2.1. Titulação Potenciométrica	16
1.2.2. Titulação UV-Vis	17
1.2.3. Espectrometria no Infravermelho (IR)	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.1.1. Objetivos específicos	20
3. MATERIAS E MÉTODOS	21
3.1. Ensaíos em solução aquosa	22
3.1.1. Titulação Potenciométrica	22
3.1.2. Espectrofotometria de UV – Vis	23
3.2. Ensaíos com material sólido	24
3.2.1. Preparação dos sólidos	24
3.2.2. Espectrometria no Infravermelho	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Titulação Potenciométrica	25
4.2. Espectrometria de UV - Visível	37
4.3. Espectrometria no Infravermelho	52
4.4. Proposta das possíveis estruturas dos complexos formados	62
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

No presente trabalho foram realizados os estudos do equilíbrio químico do ácido hialurônico com os íons metálicos Cu^{+2} , Zn^{+2} e Gd^{+3} . Esses metais foram escolhidos devido à importância de cada um no organismo humano. A associação dos metais com o ácido hialurônico produziu complexos metálicos que foram mensurados e caracterizados. O ácido hialurônico foi escolhido para este estudo devido às suas propriedades biológicas de grande interesse na medicina. Pela titulação potenciométrica foram estudados e calculados os logaritmos das constantes de formação dos complexos detectados. Esses complexos foram estudados também por espectroscopia no ultravioleta - visível em solução aquosa, e suas características, no estado sólido, por espectroscopia no infravermelho. As constantes de formação, em solução aquosa do biopolímero com os íons metálicos estudados demonstraram-se termodinamicamente favoráveis sendo que a proporção 2:1 ligante: metal foi a que possibilitou melhores resultados na demonstração das espécies complexadas do Cu^{+2} e Zn^{+2} e para o metal Gd^{+3} , a proporção que apresentou melhor resultado para a demonstração das espécies foi a 1:1.

A técnica de espectroscopia no UV – Vis auxiliou a confirmação dos resultados obtidos pela titulação potenciométrica, apesar de ter fornecido melhores resultados para os metais cobre e gadolínio. A técnica de espectroscopia no infravermelho possibilitou a obtenção de resultados significativos quanto à existência dos complexos e quanto à caracterização dos sítios de ligação utilizados na complexação.

A análise de todas essas técnicas possibilitou a proposição de algumas das possíveis estruturas complexas formadas entre o ácido hialurônico e os íons metálicos cobre, zinco e gadolínio.

Abstract

This work presents the chemical equilibrium studies of hyaluronic acid with the metal ions Cu(II), Zn(II) and Gd(III). These metal ions were chosen based on their importance in the human body and the hyaluronic acid by its importance in biology and medicine. The metal complexes were characterized and quantified.

Potentiometric titrations provided the binding constants for the equilibria studies. Also ultraviolet-visible spectroscopy was used to characterize the aqueous solutions and helped in monitor the formation of the complexed species. Infrared spectroscopy were used to characterize the solid obtained complexes and the binding sites attached to the chosen metal ions.

1. INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (Hial) é conhecido há mais de 50 anos. Ele é estruturalmente o mais simples e de maior frequência entre muitas ocorrências das glicosaminoglicanas. É encontrado na matriz intracelular da maioria dos vegetais, normalmente na forma de sal de sódio (hialuronato de sódio) (1). O Hial é o maior componente da matriz extracelular dos tecidos viscoelásticos e do fluido sinovial das juntas. Ele tem propriedades reológicas únicas que são incomparáveis com alguns outros polímeros sintéticos ou naturais (2).

Estudos de propriedades biológicas, estado sólido e de soluções aquosas de glicosaminoglicanas poliméricas e oligoméricas, como heparina, sulfato de queratina, sulfato de dermatina e especialmente ácido hialurônico têm sido um tópico de pesquisas ativas nos recentes anos. Entre os glicopolissacarídeos mencionados, o ácido hialurônico atrai maior atenção por ter propriedades únicas e importância biológica. O ácido hialurônico (Figura 1), ocorre naturalmente, sendo um biopolímero linear de alto peso molecular, entre 10^4 e 10^7 Da. É um polissacarídeo da matriz extracelular cuja unidade repetitiva é o dissacarídeo procedente do ácido D- glucurônico e a N- glucosamina (3).

O ácido hialurônico é a mais abundante glicosaminoglicana encontrada em tecido conectivo animal, na forma de substratos, normalmente a forma salina, hialuronato de sódio, é a de maior estabilidade, intimamente associada com proteínas. Altas concentrações de hialuronato de sódio podem ser encontradas na pele, humor vítreo, vasos sanguíneos, discos intervertebrais, cartilagem e cordão umbilical, onde controla o nível de hidratação dos tecidos, e realiza importantes funções estruturais e mecânicas (3-5).

Em fluido sinovial, por exemplo, a concentração de ácido hialurônico encontrada pode estar entre 1,4 - 3,6 mg/mL, sendo essencial para função normal das junções, não somente agindo como filtro na difusão molecular através da matriz extracelular, mas também conferindo as propriedades reológicas necessárias de preenchimento espacial, viscoelasticidade, absorção de choques e lubrificidade ótima entre as junções (6,7). Interesses em ácido hialurônico estão

em constante desenvolvimento devido aos recentes trabalhos que têm mostrado que a presença de hialuronato não é somente importante do ponto de vista mecânico, mas também pode influenciar diversos processos biológicos, como migração celular, diferenciação, reconstituição e adesão (7).

Estas notáveis características associadas com biocompatibilidade e imunogenicidade fazem do ácido hialurônico, o mais usado polímero biomédico. Nos últimos anos, o ácido hialurônico tem sido produzido industrialmente usando bactérias como recurso e essa produção é de baixo custo e alta pureza. Hialuronato bacteriano tem aplicação em um variado campo, como produtos cosméticos, cirurgia de visco-suplementação oftálmica, terapia osteoartrite, controle de metástase de câncer, hidrogéis biomédicos, materiais biocompatíveis para pele artificial, enchimento de osso, e suporte para novos medicamentos (3).

Nestas aplicações, as propriedades da solução de ácido hialurônico são muito importantes e têm sido muito estudadas. Ao contrário, a capacidade do ácido hialurônico para complexar íons metálicos de transição têm sido pouco estudada. Complexos metálicos de ácido hialurônico com cobre, prata, ouro, cério, tungstênio, platina e zinco foram isolados ou detectados. Complexos de ácido hialurônico com metais pesados possuem atividade microbiana, já os complexos de ouro podem ser usados em tratamento antiartrite (8,9).

A distribuição seqüencial de grupos carboxilatos na metade do dissacarídeo referente ao ácido glucurônico da cadeia de ácido hialurônico é um sítio base de Lewis que pode induzir a complexação do ácido hialurônico com íons metálicos, preferencialmente ou por interações adicionais via os oxigênios das hidroxilas ou via grupo amida (N – , também base de Lewis) da porção glucosamina (3).

A atividade do Hial está relacionada com suas propriedades reológicas que dependem de sua concentração fisiológica e seu peso molecular. Também é usado clinicamente devido à sua capacidade para modular um número de funções celulares. Além do peso molecular, fatores adicionais são considerados quando se avalia a composição e a propriedade dos complexos metálicos de hialuronato formados. Existem sítios potenciais de ligação para os íons metálicos, que são os grupos carboxilatos e acetamidos sendo que a disponibilidade está fortemente

dependente do pH. A composição dos compostos de coordenação também muda com a razão molar do íon metálico em relação ao Hial (1).

Atualmente, um grande esforço tem sido feito para melhorar a compatibilidade celular de biomateriais que são usados para a construção de prótese cardiovascular, ortopédica, cirurgia plástica e reconstrutiva. Um dos pontos relevantes para a redução da rejeição desses biomateriais em humanos é a biocompatibilidade da matriz celular, especialmente, no caso de prótese cardiovascular, há necessidade de que ocorra adesão, fixação e difusão da célula endotelial vascular no biomaterial. Os íons metálicos cobre e zinco são componentes importantes para a função das células endoteliais, concentrações micromolares de cobre induzem a proliferação dessas células e sua migração. O íon metálico zinco também estimula a proliferação das células endoteliais e promove a reconstituição de monocamadas feridas desse tipo de células (10).

Um importante ponto, que normalmente é negligenciado quando se estuda esses tipos de sistema, é a pureza da substância. O Hial contém considerável quantidade de proteínas que também se ligam aos íons metálicos e influenciam a composição do produto (1).

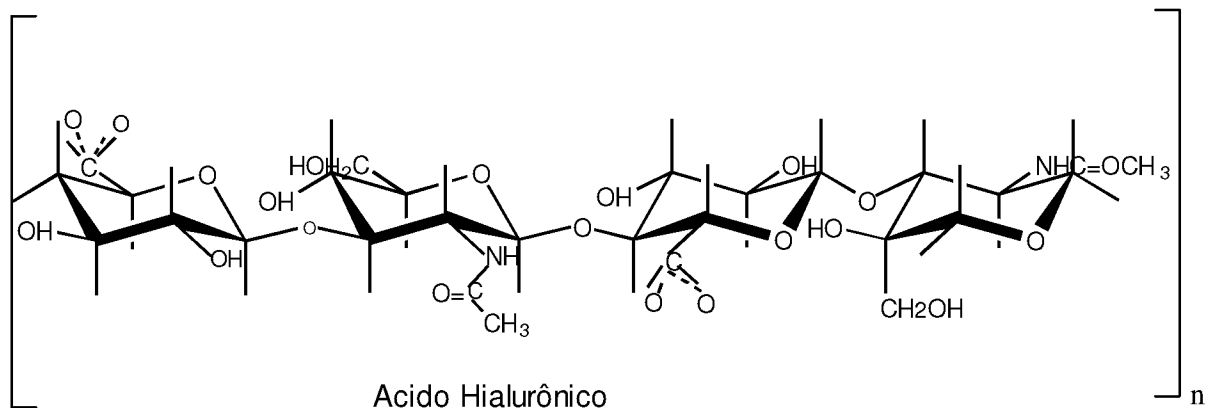


Figura1. Estrutura do ácido hialurônico.

1.1. Íons Metálicos

O comportamento dos elementos metálicos, assim como o dos complexos formados por esses com macromoléculas, está diretamente ligado à sua natureza química. Refletem em primeiro plano, propriedades que têm origem na configuração eletrônica e espacial, influenciando a afinidade por centros coordenantes e o comportamento redox. Como os íons metálicos não se encontram livres na natureza, o ambiente químico que os cerca é constituído pelos ligantes que definem a esfera interna de coordenação. Desta maneira os ligantes, que podem ser moléculas ou íons, interagem diretamente com o íon central, definindo a orientação dos complexos em função de requisitos eletrônicos e esféricos (4).

Tradicionalmente, o íon metálico é considerado um receptor de pares eletrônicos, ou ácido de Lewis, ao passo que o ligante é tido como doador de pares de elétrons, ou base de Lewis. Portanto, a formação das ligações nos complexos envolve contribuições eletrostáticas covalentes e de solvatação, podendo ocorrer eventualmente uma “retrodoação” eletrônica do ligante para o metal, detectável por bandas de transferência eletrônica no UV - Vis (11).

Os metais de estudo para o presente trabalho são: cobre, zinco e gadolínio. O cobre e o zinco são considerados ácidos de Lewis intermediários em relação à dureza e maciez, ou seja, não são extremamente duros e nem extremamente macios, o gadolínio é considerado ácido de Lewis duro (12).

O zinco e o cobre são constituintes essenciais de macromoléculas como enzimas e proteínas solúveis (13). O metal gadolínio é utilizado principalmente em tomografias como agente de contraste (14).

Cobre (Cu⁺²)

Complexos de cobre, como os de zinco, também são importantes nas funções das células endoteliais. Concentrações micromolares de cobre induzem a migração dessas células e sua proliferação por mecanismos desconhecidos (10). Biologicamente, o uso mais comum do cobre está relacionado à transferência de elétrons, especialmente associado com enzimas oxidativas (13).

O cobre é essencial à vida e uma pessoa adulta tem no organismo cerca de 100 mg de cobre. É a terceira maior quantidade de um metal de transição, inferior apenas ao ferro e zinco. O cobre liga-se a proteínas do organismo, como metaloproteínas, ou como enzimas.

A doença de Wilson é uma deficiência hereditária que provoca acúmulo de cobre no fígado, rins e cérebro. Essa doença é tratada administrando ao paciente um agente quelante como EDTA. Forma-se um complexo com o cobre e este é eliminado (15).

Zinco (Zn⁺²)

Complexos de zinco com ácido hialurônico são importantes nas funções das células endoteliais, estas células fazem o revestimento dos vasos sanguíneos. O zinco estimula a proliferação dessas células e promove o reparo das monocamadas deste tipo de célula (10). O zinco é o metal catalítico mais comum no citoplasma celular, também formando uma grande variedade de enzimas reativas no citoplasma. Está relacionado na formação estrutural de filamentos e nas funções reguladoras no DNA de seres eucariontes (13) exercendo um importante papel nos sistemas enzimáticos de animais e plantas. O organismo de uma pessoa adulta contém cerca de 2,0 g de zinco. Trata - se do segundo elemento de transição mais abundante, depois do ferro (15).

Gadolínio (Gd^{+3})

É conhecido que os íons trivalentes de terras raras são facilmente complexados por grupos carboxilatos, devido a serem considerados ácidos duros de Lewis (13). Complexos de gadolínio com ligantes polissacarídeos vêm sendo utilizados como agentes de contraste de tecidos específicos como cérebro, fígado, estrutura vascular e espinha dorsal, em métodos de diagnósticos baseados em imagens de ressonância magnética nuclear (RMN) (14). O interesse no estudo da complexação do íon Gd^{+3} com ácido hialurônico é obter um novo agente de contraste macromolecular biocompatível com melhores propriedades, dada a provável complexação via carboxilato e imunogenicidade do ácido hialurônico. Além disso, a afinidade do ácido hialurônico pelos tecidos adiposos tumorais pode ser melhorada por funcionalização com aminoácidos, previamente à sua complexação.

Os complexos de gadolínio são geralmente octacoordenados e apenas uma única molécula de água está coordenada ao íon metálico. Sais de lantanídeos geralmente hidrolisam na forma de hidróxidos que acumulam no corpo, especialmente no baço, fígado e ossos. Os caminhos de excreção do íon lantanídeo são urina e fezes simultaneamente. Na forma de complexo metálico a excreção renal é aumentada geralmente e conseqüentemente, a toxicidade diminui. Os agentes de contraste são geralmente administrados por infusão, inicialmente o complexo está somente localizado no sangue o qual representa cerca de 8% da massa corporal. Após poucos minutos, o complexo está redistribuído dentro do espaço fluidal extracelular o qual representa cerca de 30% da massa corporal (16).

A estabilidade desses complexos é muito importante, com valores de pKa sempre menores que 20. Assim após injeção de solução a 0,1mmol/Kg a concentração iônica de Gd^{+3} livre no sangue encontra-se abaixo do limite de detecção de muitos métodos analíticos.

1.2. Técnicas de Análise

Entre as técnicas de análise utilizadas para o estudo da ocorrência e estabilidade dos complexos obtidos com polissacarídeos e íons metálicos estão: titulação potenciométrica, estudos dos espectros obtidos por espectroscopia no UV-Vis, análises de espectros no infravermelho e por micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

1.2.1. Titulação Potenciométrica

A técnica de titulação é geralmente acompanhada de bruscas variações de concentração das substâncias iônicas envolvidas, que ocorrem em torno do ponto de equivalência. Neste sentido, a técnica de titulação potenciométrica consiste em seguir a variação da concentração de uma certa espécie iônica com o auxílio de um eletrodo indicador adequado, enquanto é adicionada uma solução titulante, sendo o ponto final acusado pela variação brusca de potencial da célula galvânica na qual o eletrodo está submerso. Dessa maneira, o equipamento necessário para a realização da titulação potenciométrica é formado por um eletrodo indicador, que é escolhido de acordo com a natureza da reação envolvida, e um eletrodo de referência, submerso em uma solução apropriada. Não requer medidas absolutas de f.e.m., bastando uma medida relativa no curso da titulação, sendo necessário apenas que o potencial do eletrodo de referência se mantenha constante, possibilitando uma considerável simplificação do equipamento necessário à titulação (17).

Por ser bastante sensível, a técnica potenciométrica pode ser facilmente utilizada em soluções relativamente diluídas. No caso de soluções coradas ou turvas, que geralmente impossibilitam o uso da técnica visual, a potenciometria não apresenta maiores dificuldades. A técnica potenciométrica permite aproveitar certas reações para as quais não existem indicadores apropriados, determinar sucessivamente vários componentes e também pode ser usada em meios não

aquosos, dependendo dos eletrodos utilizados. É facilmente adaptável a instrumentos automáticos (17).

A titulação potenciométrica é uma importante ferramenta para estudar soluções de bases de Lewis, ligantes potenciais, dentre eles alguns polissacarídeos e íons metálicos, ácidos de Lewis, pois permite a obtenção das constantes de protonação dos ligantes, e a partir desse e de outros dados, é possível determinar as constantes de formação dos complexos ligante-metal e a distribuição das espécies em função de diferentes valores de pH, utilizando-se programas de computador adequados. A obtenção desses parâmetros auxilia a verificação da ocorrência e a estabilidade dos complexos Hial-metal. Para os estudos com substâncias poliméricas, utilizou-se como apoio trabalhos já realizados anteriormente no Laboratório de Equilíbrio Químico (LEQ), utilizando-se programas de microcomputador que foram adaptados com sucesso para substâncias macromoleculares (18-21). Para obtenção de algumas informações sobre a identificação dos sítios metálicos de coordenação, foram utilizadas medidas espectroscópicas, descritas a seguir.

1.2.2. Titulação UV-Vis

Pode-se dizer que a titulação no UV-Vis é uma técnica específica de titulação espectrofotométrica que, como qualquer método de titulometria, consiste em acompanhar variações bruscas de concentração de substâncias de interesse. Nesse caso, as variações de concentrações são acompanhadas pela variação da absorvância da solução em questão durante a titulação. De acordo com a lei de Beer, a absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente (17).

O espectro no ultravioleta-visível (UV-Vis) é obtido quando uma radiação eletromagnética na região do UV ou visível passa através de um composto que contém cromóforos, que absorvem parte dessa radiação. As análises do espectro no UV-Vis permitem reconhecer quais são as bandas de transição, verificar suas modificações de acordo com o pH na medida em que as espécies complexadas

vão sendo formadas ou desfeitas. Além de informar em especial no caso dos metais de transição sobre a coordenação destes metais, uma vez que a absorção na região do ultravioleta e do visível é quantizada, também informam a dependência da estrutura eletrônica analisada.

As titulações desse tipo apresentam uma série de vantagens em relação aos demais métodos que envolvem determinações absorciométricas diretas. A técnica de titulação UV-Vis é relativamente simples, envolvendo posicionar a solução a ser titulada no caminho óptico de um espectrofotômetro. Através desta técnica podem ser obtidos dados comparativos aos da titulação potenciométrica, os quais quando relacionados com o ligante puro e na presença dos íons metálicos, têm a finalidade de identificar as transições específicas referentes aos complexos formados (15).

1.2.3. Espectrometria no Infravermelho (IR)

Existem inúmeras técnicas que permitem obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas das substâncias. Dentre elas podemos citar a espectroscopia no infravermelho, que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus objetivos principais a determinação dos níveis de energia dos átomos e das moléculas (21). Especificamente, a espectroscopia no infravermelho permite a observação dos espectros relativos aos movimentos de translação, rotacionais e vibracionais das moléculas, ou de determinados grupos estruturais (22).

A espectroscopia vibracional no infravermelho é uma ferramenta possível para a determinação dos sítios de coordenação do ácido hialurônico com o íon metálico correspondente. A complexação pode deslocar significativamente algumas bandas de absorção do ácido hialurônico coordenado em relação às bandas do ligante livre, e mesmo analisar as bandas novas que eventualmente apareçam no espectro obtido nas condições experimentais empregadas (3).

A espectrometria no infravermelho (IR) é uma das técnicas mais interessantes para determinação da estrutura de compostos orgânicos e

inorgânicos. Muitos compostos que absorvem radiação nas regiões do espectro eletromagnético correspondente ao Visível e Ultravioleta, também absorvem radiação em regiões do infravermelho.

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade para a química orgânica está situada entre 4000 e 666 cm^{-1} . A radiação infravermelha não libera energia suficiente para promover a excitação eletrônica, no entanto é suficiente para transições de diferentes níveis vibracionais. Para cada molécula o número de vibrações possíveis está relacionado com o número de átomos ligados, ou seja, o número de ligações existentes na molécula (17,22).

Estudos feitos em Espectrometria no Infravermelho para polissacarídeos podem auxiliar a respeito do tipo de interação entre as moléculas e entre os outros constituintes do complexo formado entre o polissacarídeo e o íon metálico e, em alguns casos, possibilita inferir sobre qual é o sítio de ligação desses complexos pela observação de mudanças nas bandas de absorção (3).

Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de grupos que permitem a obtenção de informações estruturais úteis, através de consulta a tabelas e de um simples exame do espectro (17,22).

Quando se verifica definições ou modificações em bandas, como por exemplo, as de OH no plano ou fora do plano, deformações de carbonila, carboxilato e do estiramento C-O-C, entre outras, pode-se comparativamente avaliar a complexação. Além disso, a Espectrometria no Infravermelho possibilita a obtenção de informações a respeito da estrutura do material em questão, a orientação dos grupos que o compõem e também traz informações sobre os complexos metálicos, sabendo-se que a absorção de radiação não ocorre somente para moléculas orgânicas, mas também para os complexos metálicos ligados covalentemente (17,22).

Obtendo os espectros nas regiões citadas anteriormente e fazendo a análise dos espectros é possível verificar os prováveis sítios de complexação que foram utilizados na formação dos complexos metálicos. Para o ácido hialurônico existem três possíveis sítios de ligação que são o grupo carboxila, amida e a hidroxila do C-6 do anel de açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é a síntese, caracterização e estudo das propriedades de novos complexos de ácido hialurônico com íons metálicos, cobre, zinco e gadolínio.

2.1.1. Objetivos específicos

Estes metais foram escolhidos com a idéia de obter novos biomateriais com aplicações biomédicas potenciais, devido às importantes funções dos metais no organismo humano. As aplicações biomédicas dos complexos dependem, entre outros fatores, da estabilidade dos complexos nas condições de pH fisiológico e em presença de ligantes biológicos extracelulares competitivos, assim em relação à sua forma física, como sólido, filme ou gel. Para tal, esse trabalho foi dividido em objetivos específicos utilizando-se os passos descritos abaixo.

- 1) Verificar a ocorrência e estabilidade dos complexos formados com os íons metálicos, Cu^{2+} , Zn^{2+} e Gd^{3+} , utilizando-se titulações potenciométricas e através o cálculo de suas constantes de estabilidade e especiação segundo a variação de pH com programas de microcomputador adequados..

- 2) Analisar os complexos formados com o Hial, através do estudo entre as diferenças de bandas e máximos de absorções por titulação UV-Vis e comparados às do Hial na ausência de íons metálicos.
- 3) Verificar a manutenção e analisar os complexos formados no estado sólido, em valores de diferentes pH através da espectroscopia no infravermelho para proposição dos sítios de ligação preferenciais do Hial frente aos íons metálicos estudados.
- 4) Propor possíveis estruturas dos complexos formados entre o Hial e os metais estudados com base em todos os resultados obtidos pelas técnicas e cálculos e comparações citados anteriormente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse estudo foi utilizado o hialuronato de sódio sintetizado por via bacteriana na faculdade de Química Tecnológica de Bratislava, Eslováquia. O hialuronato de sódio foi transformado em ácido hialurônico da seguinte maneira. Adicionou-se 0,50 g de hialuronato de sódio em 35,0 mL de etanol absoluto, nesta solução adicionou-se 15 mL de ácido clorídrico na concentração 0,10 mol/L e deixou sob agitação durante 10 minutos. Filtra-se a vácuo e o produto (ácido hialurônico) é lavado com solução de etanol / ácido clorídrico (70/30 V/V) por duas vezes. Em seguida o produto é lavado somente com etanol absoluto.

As soluções dos metais utilizadas foram feitas a partir de sais de nitrato (Baker, USA) para o cobre e zinco e sal de cloreto hexahidratado (Aldrich) para o gadolínio. As concentrações das soluções dos íons metálicos foram de aproximadamente 10^{-2} mol/L tanto nas soluções aquosas em geral, quanto na presença do Hial. As soluções metálicas foram tituladas com EDTA e indicadores apropriados segundo a literatura (23).

3.1. Ensaio em solução aquosa

3.1.1. Titulação Potenciométrica

Os estudos de titulação potenciométrica foram realizados com soluções de Hial puro na concentração de 0,1 mmol/L e com soluções de Hial com os metais Cu^{+2} , Zn^{+2} e Gd^{+3} , em diferentes proporções metal – ligante 1:1 (M:L) e 2:1 (M:L). A faixa de pH estudada está entre 2,9 a 10 (sem adição de ácido) e as soluções foram tituladas com KOH aquoso (previamente padronizado com biftalato de potássio – Carlo Erba – Italy) em bureta de pistão manual – Sigma Techware – capacidade de 25,00 mL, com incrementos de 0,02 mL, sob atmosfera inerte (N_2), a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (banho termostatizado MQBTC – 99 – 20 Microquímica – Brasil).

Utilizou-se o eletrodo seletivo de hidrogênio e o eletrodo referência de calomelano (Analyser – Brasil). A força iônica do meio foi mantida constante pela adição de KNO_3 0,100 mol/L (Merck – Alemanha) segundo a metodologia listada na literatura (1,4, 14 – 16). O sistema de titulação potenciométrica utilizado está representado pela Figura 2. O tratamento dos dados obtidos nas titulações potenciométricas foi realizado utilizando-se programas de microcomputadores específicos (BEST7 e SPE) (24) para o cálculo das constantes de formação dos complexos metal: Hial bem como as constantes de protonação do Hial. Também foi possível a obtenção da distribuição das espécies em solução a diferentes valores de pH. Todas as titulações foram realizadas em triplicatas.



Figura 2- Sistema de Titulação Potenciométrica existente no Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química (UFPR).

3.1.2. Espectrofotometria de UV – Vis

Para realizar os espectros de UV – Vis utilizou-se o equipamento Hewlett-Packard (modelo 8452 – diode array spectrophotometer – USA), utilizando-se alíquotas de 5 mL de solução aquosa de Hial na concentração de 10^{-3} mol/L e soluções preparadas a partir de 5 mL de solução de Hial 10^{-3} mol/L com 5 mL de solução dos metais cobre, zinco e gadolínio nas concentrações 10^{-3} mol/L. A proporção utilizada em todos os ensaios de metal:ligante foi de 1:1, essas soluções foram tituladas com volumes variáveis de solução de KOH (0,01, 0,1 e 1 mol/L) para que ocorresse a variação do pH inicial (em torno de 2,9) em incrementos de no máximo 1 unidade de pH, efetuando assim as leituras em diferentes valores de pH até no máximo pH 11 quando possível. As varreduras

foram feitas na faixa de 200 a 800 nm para as alíquotas com diferentes valores de pH, em cubeta de quartzo, à temperatura ambiente, de acordo com a metodologia relatada na literatura (19).

3.2. Ensaio com material sólido

3.2.1. Preparação dos sólidos

Os complexos sólidos de Hial – metal foram preparados da seguinte maneira. Partindo-se de uma solução aquosa de Hial com concentração de 0,10 mmol em 40,0 mL e pH inicial em torno de 2,9, sob agitação magnética e temperatura de aproximadamente 35 °C, adicionou-se os metais na proporção de 2:1 ligante: metal. Nesta solução de Hial - metal adicionou-se KOH aquoso (0,01 mol/L) variando-se o pH de 0,5 em 0,5 unidades quando possível sendo que para cada valor de pH determinado, uma alíquota era retirada e seca em estufa à temperatura de 60°C por um dia. Os sólidos obtidos foram utilizados nas análises de espectroscopia no infravermelho (IR).

3.2.2. Espectrometria no Infravermelho

Os espectros de infravermelho (IR) foram obtidos em equipamento FTIR BIORAD Excalibur Series – FTS – 3500 GX. Usando-se pastilhas de KBr com concentração de 1% do complexo sólido. Os sólidos foram homogeneizados juntamente com KBr previamente seco em graal para, em seguida, se obter as pastilhas. A varredura foi feita na faixa de 4000 – 400 cm^{-1} . A metodologia para a obtenção dos complexos sólidos foi feita no Laboratório de Equilíbrio Químico, segundo a orientação de trabalhos anteriores (3, 25-27).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Titulação Potenciométrica

A titulação potenciométrica é uma técnica importante de auxílio no estudo das soluções de ligantes potencialmente básicos e íons metálicos. Através da técnica é possível obter as constantes de protonação dos ligantes e relacioná-las com as constantes de formação dos complexos ligante-metal e a partir desses dados encontrar as espécies em função de diferentes valores de pH (3,19–22, 28).

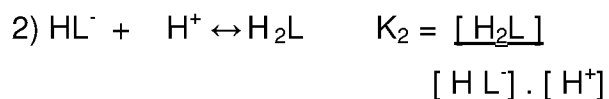
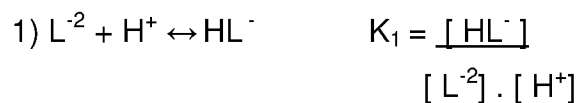
Para a obtenção das constantes de protonação dos ligantes e das constantes de formação dos complexos ligante – metal, além da especiação segundo o pH, utilizou-se os programas BEST 7 e SPE para tratar os dados e obter os resultados desejados (28).

O programa BEST 7 (28) é utilizado para determinar as constantes de estabilidade e, ou protonação do sistema, bem como corrigir a concentração do ligante presente no equilíbrio, por meio de tratamento estatístico dos dados obtidos das curvas de titulação potenciométrica. O programa também possibilita conhecer as constantes de formação globais para os complexos metálicos formados, quando se adiciona na matriz de cálculo do programa as constantes das espécies hidrolíticas possíveis para aquele sistema em equilíbrio.

As espécies hidrolíticas levadas em consideração para todos os cálculos efetuados no trabalho foram as seguintes: $Gd(OH)^{+2}$, $Gd(OH)_2^+$, $Gd(OH)_3$, $Gd(OH)_4^-$ para o metal gadolínio, $Cu(OH)^+$, $Cu(OH)_2$, $Cu(OH)_3^-$, $Cu(OH)_4^{-2}$, $Cu_2(OH)_2^{+2}$, $Cu_3(OH)_4^{-2}$, $Cu_2(OH)^{+3}$ para o metal cobre e $Zn(OH)^+$, $Zn(OH)_2$, $Zn(OH)_3^-$, $Zn(OH)_4^-$, $Zn_2(OH)^{+3}$, $Zn_2(OH)_6^{+2}$ para o metal zinco (24,29).

O programa SPE (26) é parte integrante do programa BEST 7, permite calcular e visualizar a distribuição das espécies presentes no equilíbrio através das constantes de estabilidade fornecidas pelo resultado do cálculo feito pelo programa BEST 7.

Os equilíbrios de protonação do ligante em solução podem ser definidos pelas equações a seguir (28):

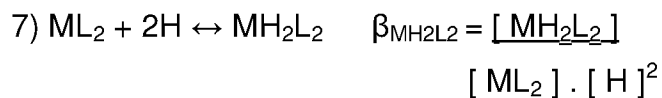
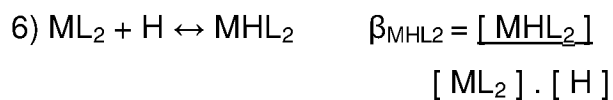
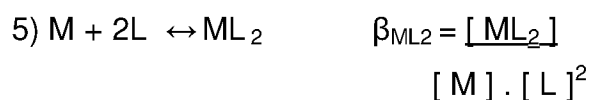


onde:

L = ligante unidade dissacarídica do Hial.

K_n = constante de protonação de n prótons.

Para o equilíbrio em solução, a obtenção das constantes de formação global dos complexos ligante – metal pode ser definida pelas seguintes equações:



onde:

L = ligante unidade dissacarídica do Hial.

M = íon metálico (Cu^{+2} , Zn^{+2} e Gd^{+3}).

ML = representação da espécie formada pela união de 1 mol de ligante com 1 mol de íon metálico.

MHL = representação da espécie equivalente ao ML, tendo apenas um único sítio da unidade dissacarídica protonado.

ML_2 = representação da espécie formada pela união de 2 mols de ligante com 1 mol de íon metálico.

MHL_2 = representação da espécie equivalente ao ML_2 com um sítio da unidade dissacarídica protonado.

MH_2L_2 = representação da espécie equivalente ao ML_2 com dois sítios da unidade dissacarídica protonados.

β_n = constantes de formação global dos complexos ligante - metal.

K = constantes de formação passo a passo dos complexos ligante – metal, protonados.

Os resultados obtidos das titulações potenciométricas estão representados graficamente, no qual se relaciona a variação de pH com o número de milimoles de KOH dividido pelo número de milimoles do ligante que é representado pela letra a.

a = milimoles de KOH / milimoles do ligante

Os gráficos representados nas Figuras 3, 4 e 5 são referentes às curvas de titulação potenciométrica do Hial 0,1 mmol e do Hial em solução com os íons metálicos cobre, zinco e gadolínio, nas proporções 1:1 e 2:1 ligante – metal. Não foi necessária a adição de ácido forte (HNO_3) antes de iniciar a titulação devido ao pH favorável do Hial em solução, que se encontra abaixo de 3,0.

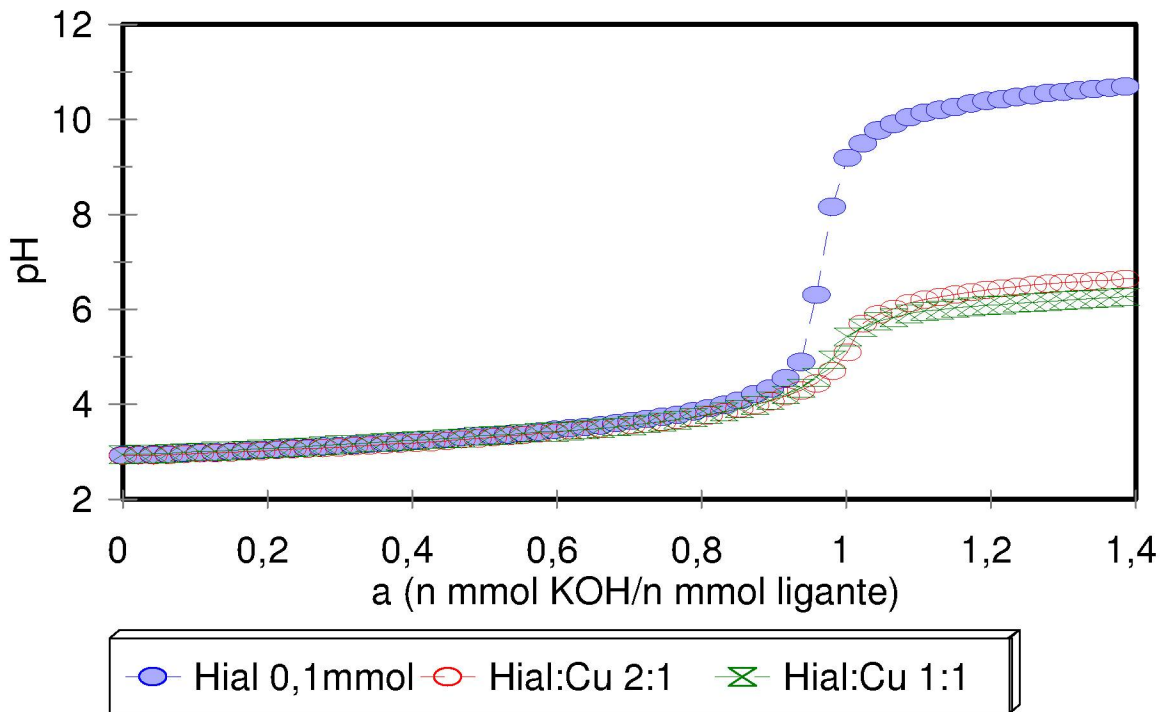


Figura 3 – Curvas de titulações potenciométricas de Hial puro, na quantidade de matéria de 0,1 mmol, e na presença do íon metálico Cu^{+2} , nas proporções de L:M 1:1 e 2:1. ($T = 25^\circ\text{C}$ e força iônica = 0,100 mol/ KNO_3).

De acordo com as curvas de titulações potenciométricas para o Hial e o íon metálico Cu^{+2} , observa-se que no início da titulação, onde o número de milimoles de KOH dividido pelo número de milimoles do ligante é igual a zero, o sistema apresenta pH em torno de 3,0 nas proporções ligante: metal 1:1 e 2:1 e também apresenta o mesmo valor de pH para a solução de Hial puro. Isso pode evidenciar que no início da titulação não ocorre complexação do metal com o ligante; a complexação se inicia apenas em torno de pH 4,0 onde se constata um abaixamento do pH das curvas do metal com o ligante em relação ao ligante puro. Este abaixamento do pH das curvas de titulações com o íon metálico é uma indicação de complexação ocorrida entre o Hial e o metal, uma vez que existindo a complexação, ocorre o deslocamento de íons H^+ do ligante (desprotonação), levando ao abaixamento do pH da solução.

Outro indicativo de complexação observado nas curvas de titulações potenciométricas para Hial: Cu é o deslocamento ao longo do eixo x. À medida

que se aumenta o valor do pH, tem-se a formação de regiões de tamponamento (“buffer”) e pontos de inflexões apresentados pela curva (break) de pH.

As curvas apresentadas de ligante: metal 1:1 e 2:1 são praticamente idênticas, mostrando que a variação da concentração do metal não influencia significativamente na formação de várias possíveis espécies complexadas e sendo possível também, a sua formação em pequenas quantidades. A formação dos produtos de hidrólise pouco solúveis ocorre em pH de aproximadamente 6,0 e se mantém até valores de pH superiores a 10,0.

Na Figura 4 estão representadas as curvas de titulações para o metal zinco juntamente com o ácido hialurônico.

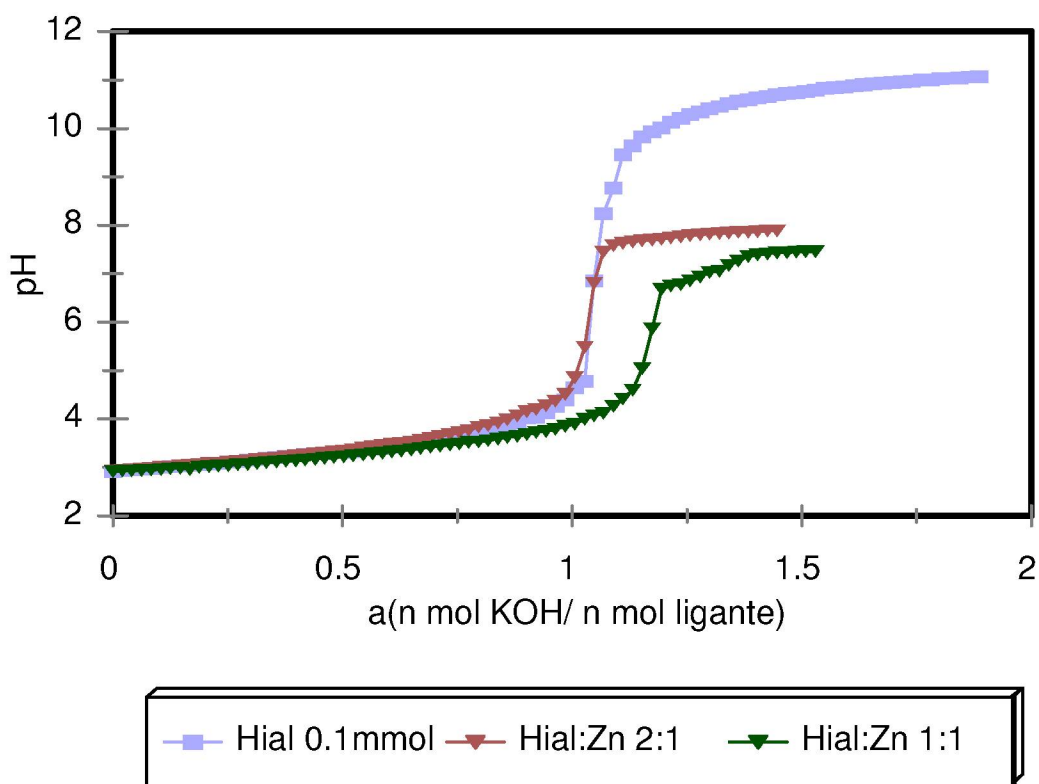


Figura 4 – Curvas de titulações potenciométricas de Hial puro, na quantidade de matéria de 0,1 mmol, e na presença do íon metálico Zn^{+2} , nas proporções de L:M 1:1 e 2:1. ($T = 25^{\circ}C$ e força iônica = 0,100 mol/ KNO_3).

Pode-se observar para as curvas de titulação potenciométrica do Hial e o íon metálico Zn^{+2} , que no início da titulação o sistema apresenta pH em torno de 3,0 nas proporções ligante: metal 1:1 e 2:1, e para o Hial puro. Isso indica que a complexação somente se inicia a valores de pH próximos de 4,0 e 7,0 respectivamente. A curva de titulação para a proporção 2:1 não apresenta diferença considerável em relação à curva do Hial puro, pois não ocorre abaixamento do pH em relação ao Hial puro ao longo da titulação, não é possível afirmar que a complexação não está acontecendo nesta proporção, ela pode estar ocorrendo com uma menor intensidade, acompanhada de hidrólise do Zn^{+2} . A formação dos produtos de hidrólise é encontrada em pH próximo de 8,0. Em relação à curva de titulação para a proporção 1:1, observa-se um abaixamento da curva em relação ao Hial puro e um deslocamento ao longo do eixo x. Essas características de apresentação da curva indicam que está acontecendo a complexação entre o ácido hialurônico e o íon metálico zinco. A formação de produtos de hidrólise se inicia em pH 7,0 aproximadamente. Em geral as espécies hidrolíticas do metal zinco se encontram em uma faixa de pH entre 7,0 a valores superiores a 10,0.

A Figura 5 apresenta as curvas de titulação para o metal gadolínio juntamente com o ácido hialurônico.

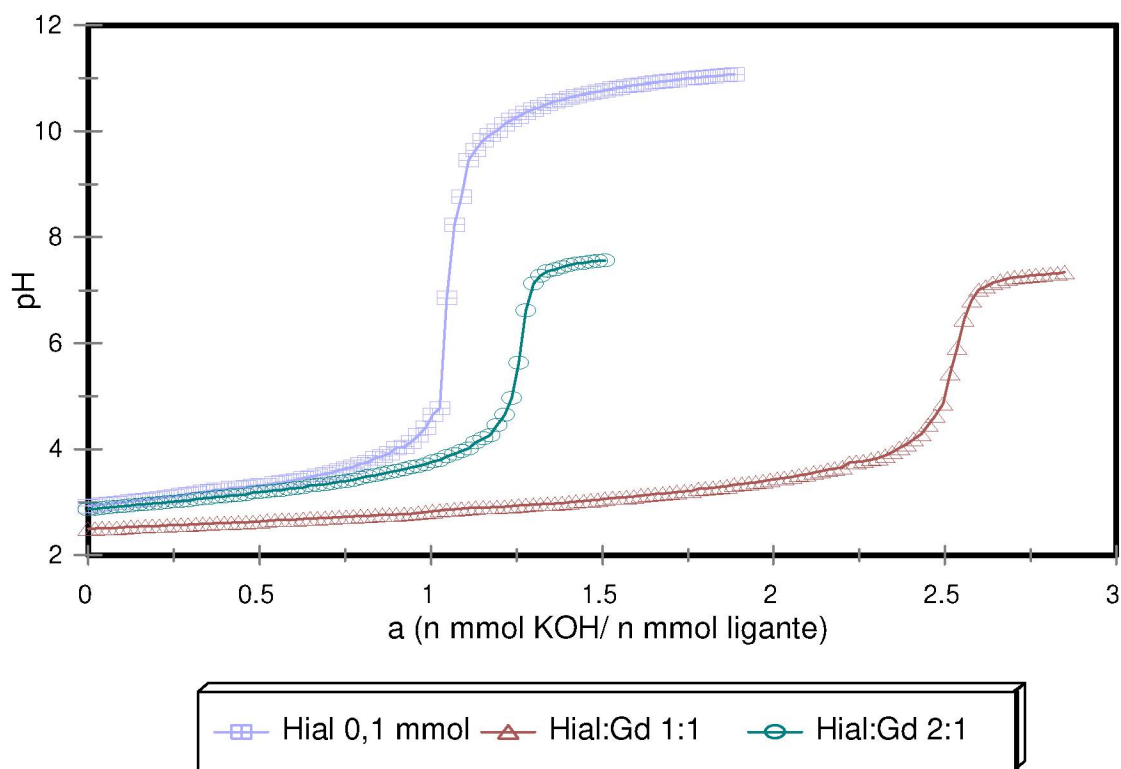


Figura 5 – Curvas de titulações potenciométricas de Hial puro, na quantidade de matéria de 0,1 mmol, e na presença do íon metálico Gd^{+3} , nas proporções de L:M 1:1 e 2:1. ($T = 25^{\circ}C$ e força iônica = 0,100 mol/ KNO_3).

Para o íon metálico Gd^{+3} , a curva de titulação referente à proporção 2:1 apresentou valor inicial de pH igual a 3,0 exatamente como o pH inicial da curva de titulação do Hial puro, indicando não complexação neste ponto. Quando a titulação está em $a = 1$ aproximadamente, a curva de titulação começou a ter um abaixamento no valor do pH e um deslocamento. Em valores de pH superiores a 8,0 temos o início da formação dos produtos de hidrólise para este metal. Em relação à curva de titulação com proporção 1:1 observou-se um grande deslocamento ao longo do eixo x, indicando uma longa região de tamponamento e um abaixamento do pH inicial em relação ao pH do Hial, indicando uma possível complexação já no início da titulação. O “break” se inicia em valores próximos de $a = 2,5$. As espécies hidrolíticas só aparecem em valores de pH superiores a 8,0. Todas os sistemas estudados por titulação potenciométrica, Hial: cobre, Hial:

zinco e Hial: gadolínio apresentaram deslocamentos ao longo do eixo x, representando grandes regiões de tamponamento.

Os valores logaritmos (logK) para as constantes de protonação do ácido hialurônico estão representados na Tabela 1 e os valores para as constantes de formação dos complexos ligante–metal, estão representados na Tabela 2 de acordo com os resultados obtidos pela titulação potenciométrica para os metais Cu^{+2} , Zn^{+2} e Gd^{+3} , tendo como base os equilíbrios apresentados anteriormente nas equações de 1 a 7. Os valores logaritmos (logK) foram obtidos através do programa de microcomputador Best 7.

Tabela 1- Constantes de protonação do ácido hialurônico (Log β)

Ácido hialurônico	Log β
H_2L	$14,79 \pm 0,05$
HL	$11,82 \pm 0,05$

Tabela 2- Constantes de formação dos complexos (Log β)

(T = 25,0°C e $\mu=0,10 \text{ mol/L}$ de KNO_3).

Espécies	Cu^{+2}	Zn^{+2}	Gd^{+3}
ML	$7,58 \pm 0,05$	$6,3 \pm 0,10$	$12,46 \pm 0,00$
ML_2	$15,04 \pm 0,08$	$12,40 \pm 0,14$	$19,78 \pm 0,02$
MHL	-	-	$15,58 \pm 0,01$
MHL_2	-	-	$26,85 \pm 0,04$
MH_2L_2	-	-	$30,00 \pm 0,14$

Os valores obtidos para as constantes de protonação do polissacarídeo (Figura 1) titulado na ausência de íon metálico são referentes à hidroxila no C-6 da porção monossacarídea glicosamida e do carboxilato da segunda porção monossacarídea do grupo hialuronato, sendo que a hidroxila apresentou um valor de log K de 11,82 enquanto que para o carboxilato o valor

obtido para o log K foi de 2,97. Estes valores estão próximos dos valores encontrados na literatura que são de 8,23 para a hidroxila e de 2,81 para o carboxilato (3).

Todos os resultados obtidos nessa técnica foram revistos e quando necessário, as titulações foram repetidas mais que em duplicata para que os valores das constantes obtidas tivessem menores erros possíveis, sendo assim de maior confiabilidade.

Utilizou-se o programa SPE para calcular e visualizar a distribuição das espécies presentes no equilíbrio. Os valores apresentados no eixo y são de 100% em relação à concentração total do metal no equilíbrio, sendo representadas curvas de máximos percentuais proporcionais à concentração de metal utilizado para a formação das espécies no meio aquoso e nas condições experimentais citadas.

Os resultados apresentados foram obtidos com os dados da proporção 2:1 para os metais cobre e zinco e na proporção 1:1 para o metal gadolínio, uma vez que estas proporções possibilitaram a visualização de todas as espécies presentes no equilíbrio.

A Figura 6 mostra diagrama de distribuição das espécies Hial: Cu presentes no equilíbrio, na proporção 2:1 com faixa de pH entre 2,0 a 10,0.

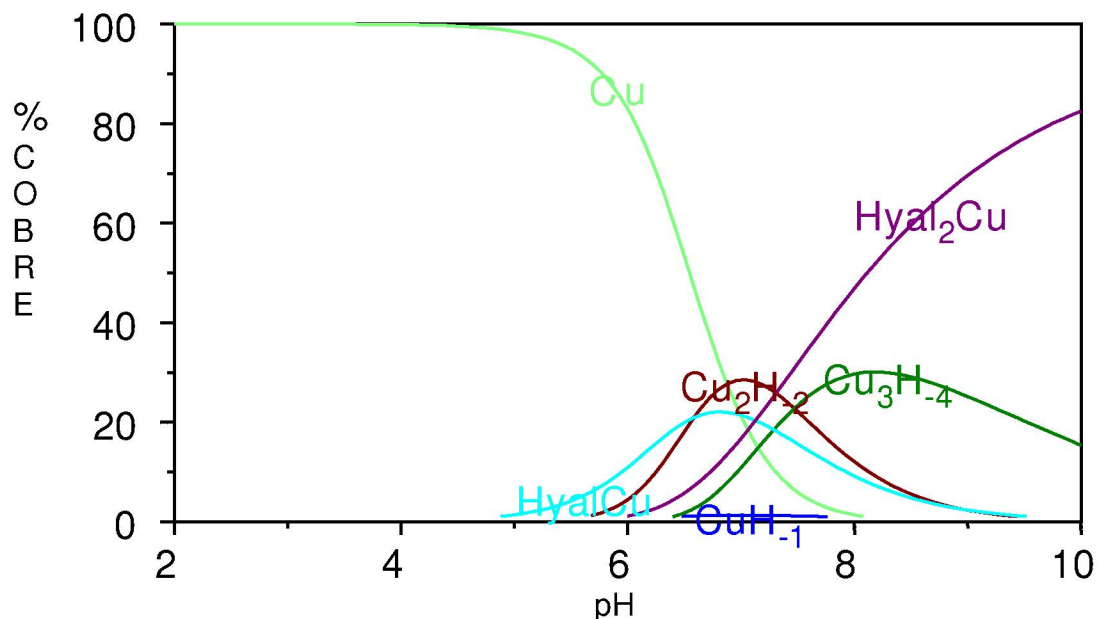


Figura 6 – Diagrama de distribuição das espécies em equilíbrio de ácido hialurônico e íon cobre, proporção 2:1, pH 2,0 – 10,0.

No diagrama de especiação para o metal cobre foi possível observação das espécies complexadas e os produtos de hidrólise do metal presentes no equilíbrio e suas respectivas faixas de pH, entre 5,0 e 10,0. É possível observar que a espécie ML inicia sua formação em pH 5,0 permanecendo no equilíbrio até pH próximo de 10,0, com máximo de concentração entre pH em torno de 7,0. Após pH 7,0 esta espécie diminui sua concentração devido à existência de outras espécies no equilíbrio, ocorrendo assim competição com estas espécies. A espécie ML_2 se inicia em pH 6,0 e se mantém até pH 10,0 com aumento da concentração de acordo com o aumento do pH. A espécie ML_2 apresentou uma concentração considerável em relação à espécie ML, visto que em pH 10,0 a espécie ML_2 encontra-se em aproximadamente 80% de formação.

Na Figura 7 está representado o diagrama de especiação para o ácido hialurônico e o metal zinco na proporção de 2:1, com variação de pH entre 2,0 a 10,0.

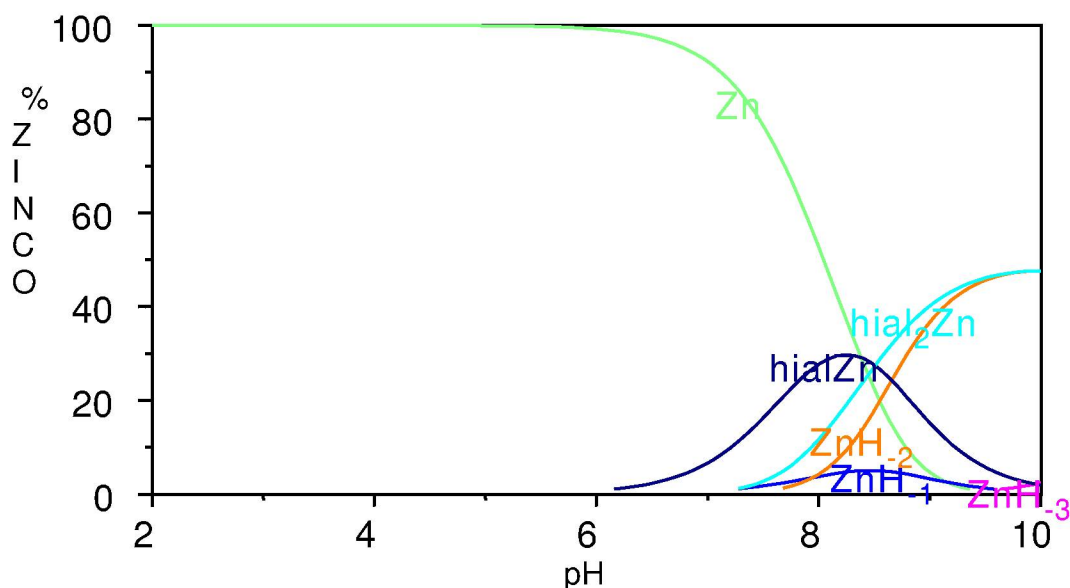


Figura 7 – Diagrama de distribuição das espécies em equilíbrio de ácido hialurônico e íon zinco, proporção 2:1, pH 2,0 – 10,0.

No diagrama de especiação para o metal zinco foi possível à observação das espécies ML e ML_2 , além dos produtos de hidrólise do metal presentes no equilíbrio. Estas espécies encontram-se na faixa de pH maiores que 6,0. É possível observar que a espécie ML inicia sua formação em pH 6,0, permanecendo no equilíbrio até pH 10,0 com máximo de concentração em pH 8,0. Após pH 7,0, esta espécie se encontra em competição com a espécie ML_2 que inicia sua formação nesta faixa de pH e apresenta um aumento de concentração proporcional ao aumento do pH. Em pH 10,0 a espécie ML_2 apresenta seu ponto máximo de concentração.

Na Figura 8 está representado o diagrama de especiação para o ácido hialurônico e o metal gadolínio na proporção de 1:1 com variação de pH entre 2,0 a 10,0.

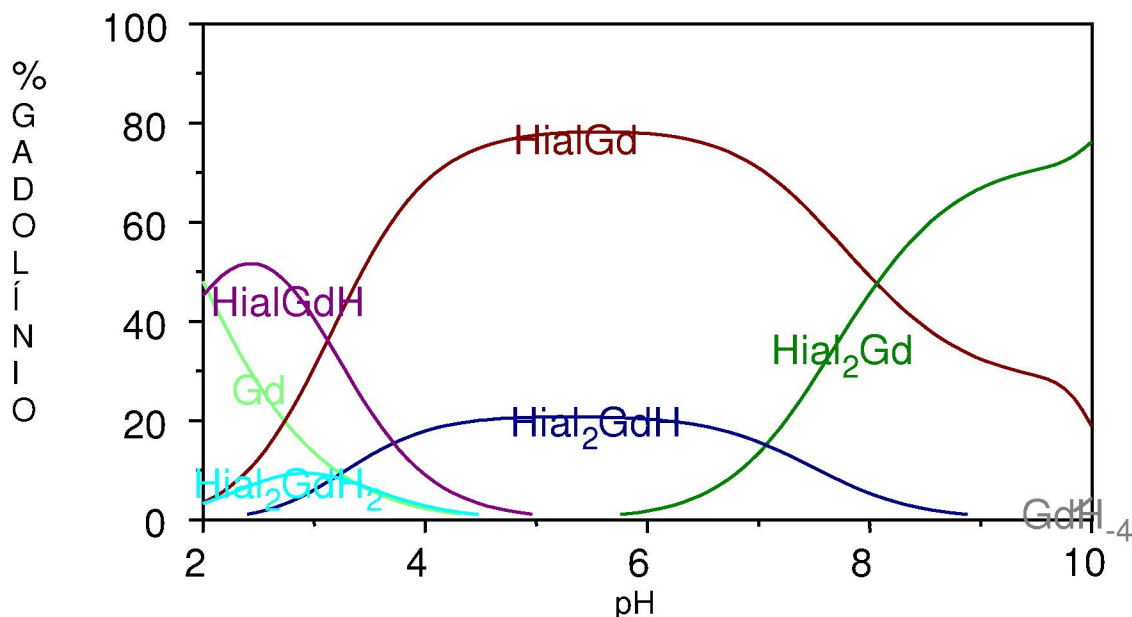


Figura 8 – Diagrama de distribuição das espécies em equilíbrio de ácido hialurônico e íon gadolínio, proporção 1:1, pH 2,0 – 10,0.

No diagrama de especiação para o metal gadolínio foi possível a observação de cinco espécies ML, ML₂, MLH, ML₂H₂ e ML₂H além da espécie de hidrólise do metal presente no equilíbrio, estas espécies encontram-se na faixa de pH entre 2,0 a 10,0. É possível observar a presença da espécie MLH e da espécie ML₂H₂ em pH 2,0 permanecendo no equilíbrio até pH próximo de 5,0 com máximo de concentração em pH entre 2,5 e 3,0. No entanto, a espécie MLH aparece com maior porcentagem de formação em relação à espécie ML₂H₂. Quanto às espécies ML e ML₂H, também estão presentes no equilíbrio em pH 2,0 competindo com as outras espécies citadas anteriormente. A espécie ML mantém-se em equilíbrio até valores de pH acima de 10,0 e seu ponto máximo de concentração está entre pH 5,0 a 7,0 com 80% de formação nesta faixa de pH. A espécie ML₂H até pH 9,0 com uma menor porcentagem de formação, cerca de 20%. A espécie ML₂ inicia sua formação em pH 6,0 e mantém-se em equilíbrio até valores de pH superiores a 10,0 aumentando sua porcentagem de formação de acordo com o aumento do pH.

Pela a análise do diagrama de especiação para o metal gadolínio é possível visualizar que a espécie ML está presente em toda a faixa de pH estudada e que existe uma grande competição entre as espécies em equilíbrio.

As espécies complexadas de cobre e zinco estão formadas a partir de pH 5 e 6 respectivamente, enquanto que para o metal gadolínio há a formação de espécies complexadas desde pH 2.

Através da técnica de titulação potenciométrica é possível demonstrar que o modelo matemático utilizado permitiu a determinação das constantes de complexação e afinidade dos íons metálicos com os sítios de ligações do biopolímero. É possível também determinar as melhores faixas de pH para se encontrar as espécies complexadas, utilizando os diagramas de distribuição das espécies. Os programas de microcomputador utilizados permitiram que os dados fossem trabalhados de maneira a apresentarem constantes de estabilidade com menores erros possíveis, já que se trata de biopolímero, um material com estrutura complexa (24,28).

4.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta

A espectroscopia na região do ultravioletal se baseia na absorção de radiação na faixa de 180 – 380 nm por moléculas inorgânicas e orgânicas, ou por complexos. Resultado da interação entre fótons e elétrons que participam diretamente da ligação, ou seja, aqueles que estão associados a um ou mais átomos ou estão localizados sobre átomos como oxigênio, enxofre, nitrogênio ou cloro. Sendo que, uma vez participantes de uma nova ligação (ligante: metal) deverão apresentar modificações, como por exemplo, no máximo de absorção ou no deslocamento ao longo do comprimento de onda (24,28-31).

Para compostos orgânicos analisam-se as ligações duplas e triplas, uma vez que nas ligações simples (compostos saturados) os elétrons estão mais fortemente envolvidos na ligação, impossibilitando a interação com a radiação (estes compostos absorvem na região do ultravioleta no vácuo, onde o

comprimento de onda é inferior a 180 nm). No entanto, compostos orgânicos saturados contendo átomos de oxigênio, enxofre, nitrogênio ou cloro, por exemplo, contém elétrons não – ligantes que podem ser excitados na região entre 180 - 250 nm. Compostos orgânicos que absorvem radiação UV – Visível são conhecidos como cromóforos, que são grupos insaturados covalentes responsáveis pela absorção eletrônica (por exemplo, C=C, C=O ou NO₂), enquanto que para os íons metálicos, em especial metais de transição, a região do espectro no qual aparece o máximo de absorção depende de sua estrutura eletrônica (24,28-31).

A Figura 9 apresenta os espectros de ultravioleta de uma solução de Hial puro na concentração de 10⁻³ mol/L, varrendo-se a faixa de 190 a 390 nm, sendo possível a observação de picos de máxima absorção na região próxima de 200 nm referente ao carboxilato do ácido hialurônico, uma vez que este grupo está presente na estrutura do Hial. Observa-se também a formação de um segundo pico com maior intensidade na região de 210 nm possivelmente de grupamento amida. É possível observar uma variação no máximo de absorção em relação à variação do pH.

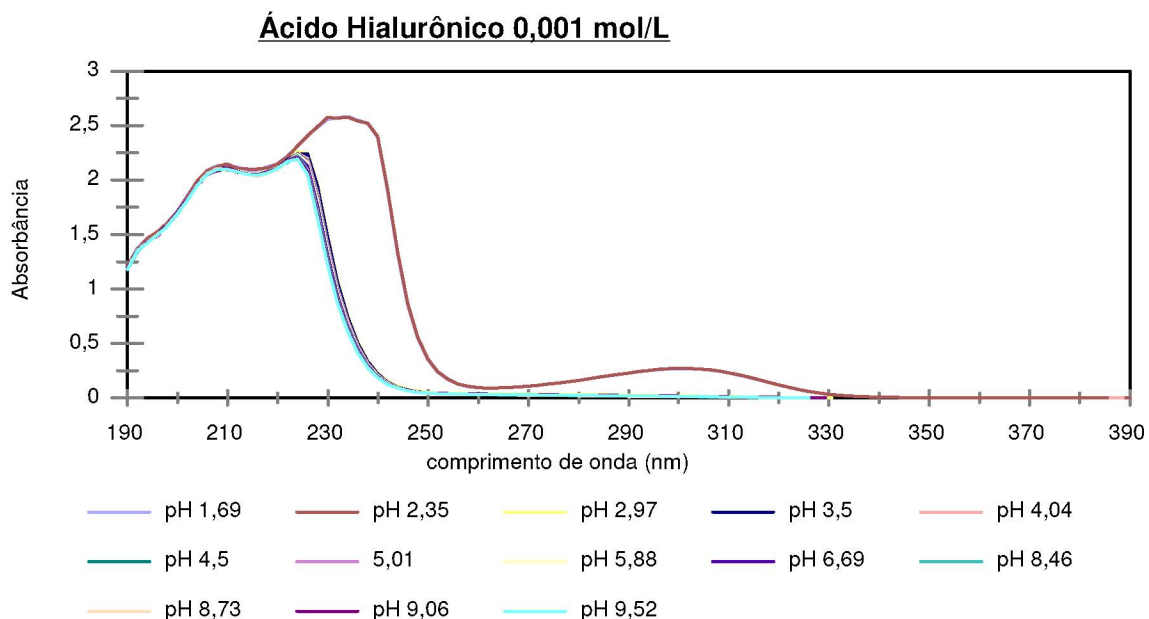


Figura 9 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico puro com concentração de 10⁻³ mol/L, varredura de 190 a 390 nm.

A Figura 10 mostra os espectros de Hial simplificados em três faixas de pH, observa-se que com o aumento de pH da solução ocorre um deslocamento do ponto máximo de absorção e diminuição da intensidade dessa absorção, isso pode ser explicado pela desprotonação da hidroxila do carboxilato (31,32). É possível perceber que esta diminuição da intensidade de absorção se mantém inalterada desde a segunda variação de pH até a última variação do pH.

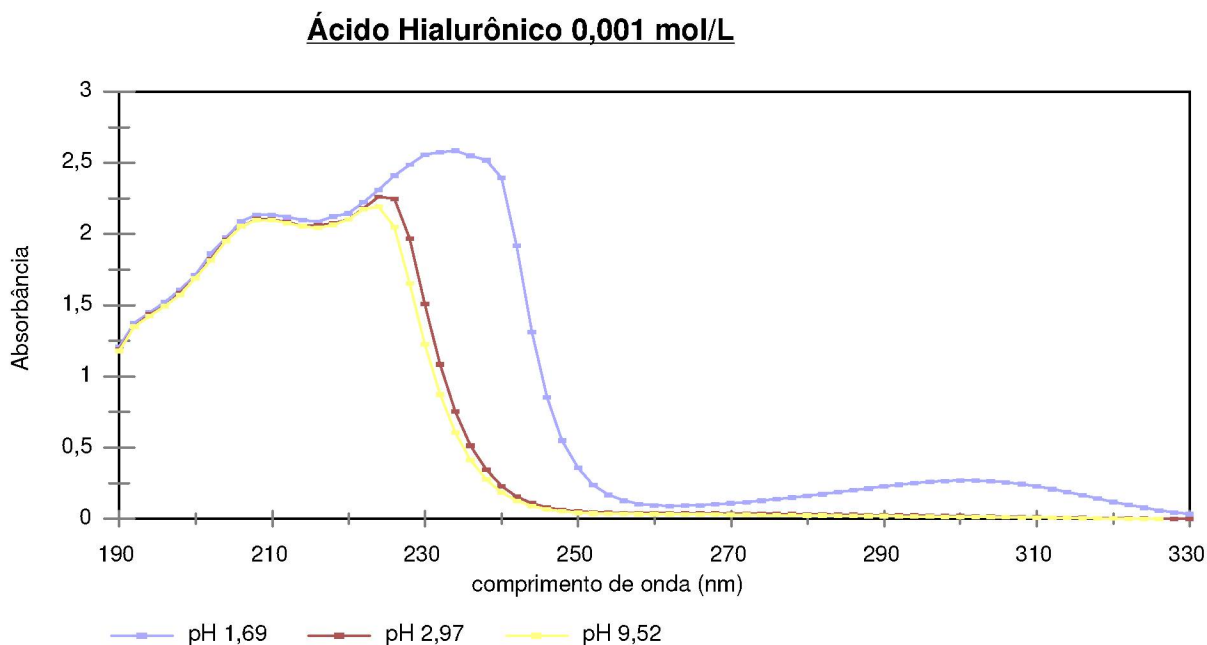


Figura 10 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico puro com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 330 nm.

Normalmente, faz-se a comparação do espectro de um composto puro com aqueles de moléculas que contenham os mesmos grupos cromóforos ou os mesmos átomos constituintes que absorvam na mesma região que o composto estudado, para possibilitar a identificação da presença ou modificação do tipo de ligação destes grupos de átomos que podem indicar a ocorrência da complexação com os metais (31,32).

As espécies inorgânicas, tais como íons e complexos de elementos da primeira série de transição absorvem radiação com picos de absorção na região do visível (380 – 800 nm), nos seus menores estados de oxidação, os quais são

coloridos. Exemplo de cor pode ser encontrado na solução de íons Cu^{+2} , a qual apresenta coloração azul. Neste caso a absorção envolve a transição de elétrons entre orbitais d preenchidos e não preenchidos, sendo suas energias dependentes dos ligantes quelados ao íon metálico. A diferença de energia entre esses orbitais d depende da posição do elemento na tabela periódica, do estado de oxidação e da natureza da ligação (campo ligante fraco ou forte).

Para visualização destas absorções como indicativo de complexação, deve-se monitorar a intensidade do máximo de absorção das mesmas, comparar os espectros do íon metálico em solução na presença do ligante com os espectros da solução do ligante e da solução do metal (24,28-31). Por esse motivo foram feitos espectros da solução de Hial puro (ausência de metais) e espectros das soluções dos metais puros (ausência do ligante) para posteriormente, obter os espectros das suas misturas.

Muitos íons e complexos inorgânicos apresentam uma absorção conhecida como absorção de transferência de carga (TC), a qual é formada por um grupo doador de elétrons ligado a um grupo receptor de elétrons. Quando este tipo de composto absorve radiação, um elétron do doador transfere-se para um orbital do receptor, tendo o estado excitado como produto de um processo de oxi-redução interno. Este comportamento difere daquele dos cromóforos orgânicos, nos quais o elétron excitado está contido em um orbital molecular que é compartilhado por dois ou mais átomos (30).

Na maioria dos complexos de transferência de carga envolvendo um íon metálico, o metal tem a função de átomo receptor de elétrons e possui intensidade maior de absorção em relação à absorção de campo ligante, por exemplo, transição do tipo d-d (30-32).

Os espectros na região do ultravioleta da solução do íon metálico Cu^{+2} estão representados na Figura 11, a varredura foi feita na faixa de 190 a 390 nm e a concentração da solução, 10^{-3} mol/L, com variação do pH.

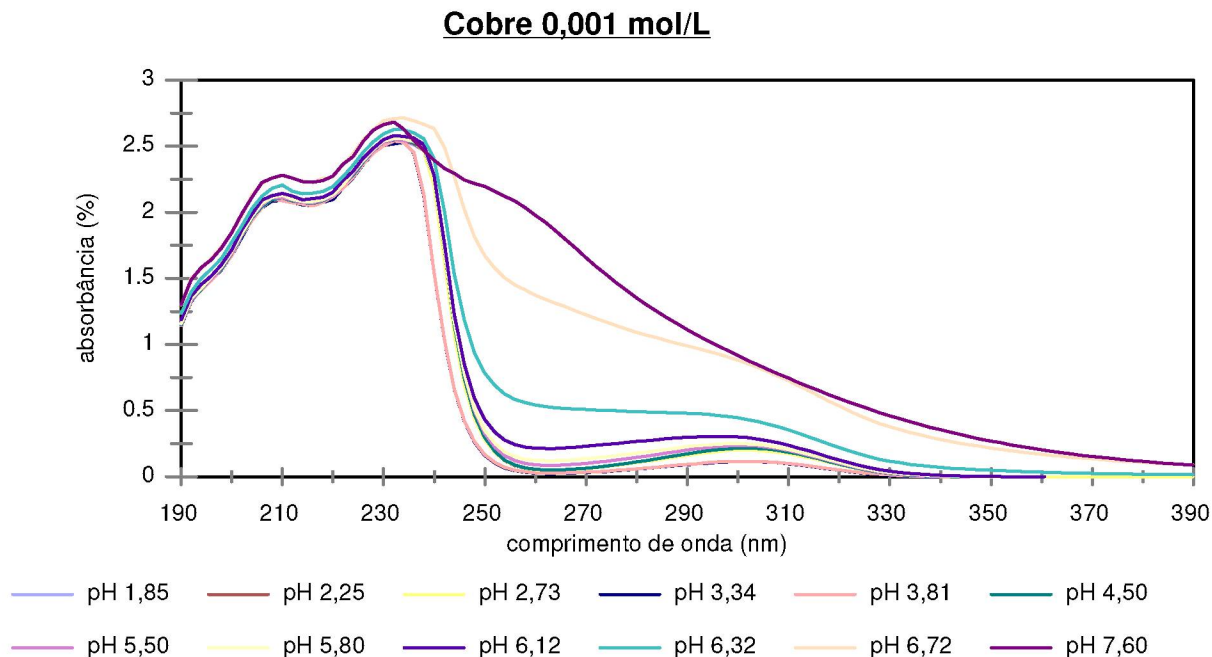


Figura 11 – Espectros de Ultravioleta para solução de cobre com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 390 nm.

Observam-se picos de absorção máxima na região próxima a 230 nm, estes picos são referentes aos átomos de oxigênio do contra íon nitrato, devido ao sal utilizado na preparação da solução de cobre $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2]$. Na faixa próxima a 290 nm apresentam-se absorções de baixa intensidade (30, 32). À medida que se variou o pH da solução foi possível observar que os picos de absorção também variaram. Já em valores maiores de pH, os espectros se apresentaram com intensidades maiores e distorcidas, isto se deve ao fato de que em valores de pH superiores a 6,0 ocorre a formação de hidróxidos de cobre, que pode ser observado na Figura 12 onde estão apresentados os espectros da solução do íon metálico Cu^{+2} em cinco faixas de pH. É possível observar que em valores de pH inferiores a 6,0 os espectros se apresentaram com absorções típicas, porém após o pH 6,0 os espectros apresentaram a formação dos produtos de hidrólise que é observado pelo alargamento das bandas de absorção.

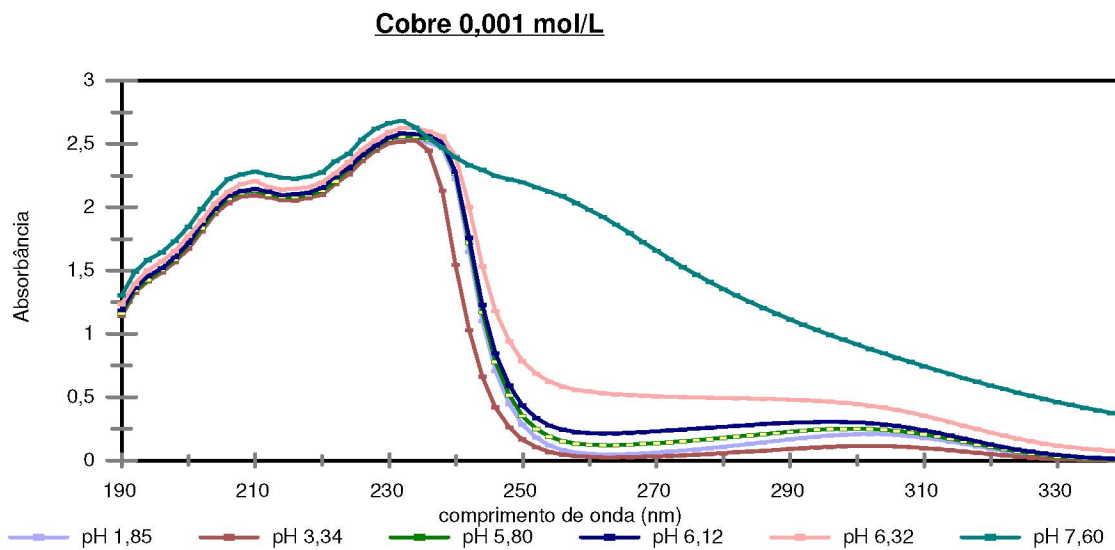


Figura 12 – Espectros de Ultravioleta para solução de cobre com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 330 nm.

A Figura 13 apresenta os espectros na região do ultravioleta de uma solução de Hial juntamente com o íon Cu^{+2} com concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram feitos na faixa de 190 a 390 nm e a proporção ligante: metal foi de 1:1.

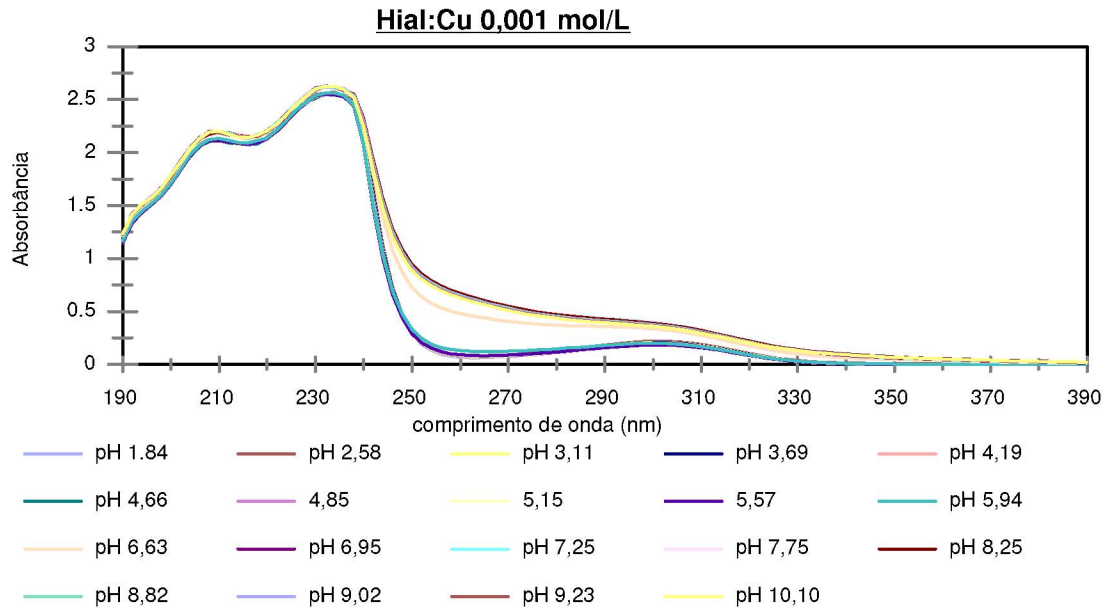


Figura 13 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico com o íon metálico Cu^{+2} em concentração de 10^{-3} mol/L, proporção 1:1 e varredura de 190 a 390 nm.

O espectro de ácido hialurônico com o íon metálico cobre apresentam algumas modificações em relação aos espectros de Hial e do íon cobre isoladamente. Observa-se uma leve redução na intensidade da absorção na região próxima a 300 nm. Os espectros apresentam variações nos máximos de absorção à medida que o pH da solução é aumentado, no entanto, essas variações são menores em relação aos espectros do Hial e do íon cobre isolados. Devido complexação do metal com o ácido hialurônico, a formação dos hidróxidos de cobre aparecem com menor intensidade, pois competem com a formação do complexo ML que se inicia em pH 5,0 e se mantém até pH 10,0 e ML_2 que se inicia em pH 6,0 e se mantém até valores de pH superiores a 10,0 de acordo com os diagramas de especiação (seção titulação potenciométrica, página 18). A Figura 14 apresenta o espectro de Hial: Cu em cinco faixas diferentes de pH. Nos espectros do Hial: Cu a formação desses hidróxidos diminui devido a complexação do metal com o Hial diminuindo assim a concentração de íons cobre livres em solução para formação dos hidróxidos.

Hial:Cu 0,001 mol/L

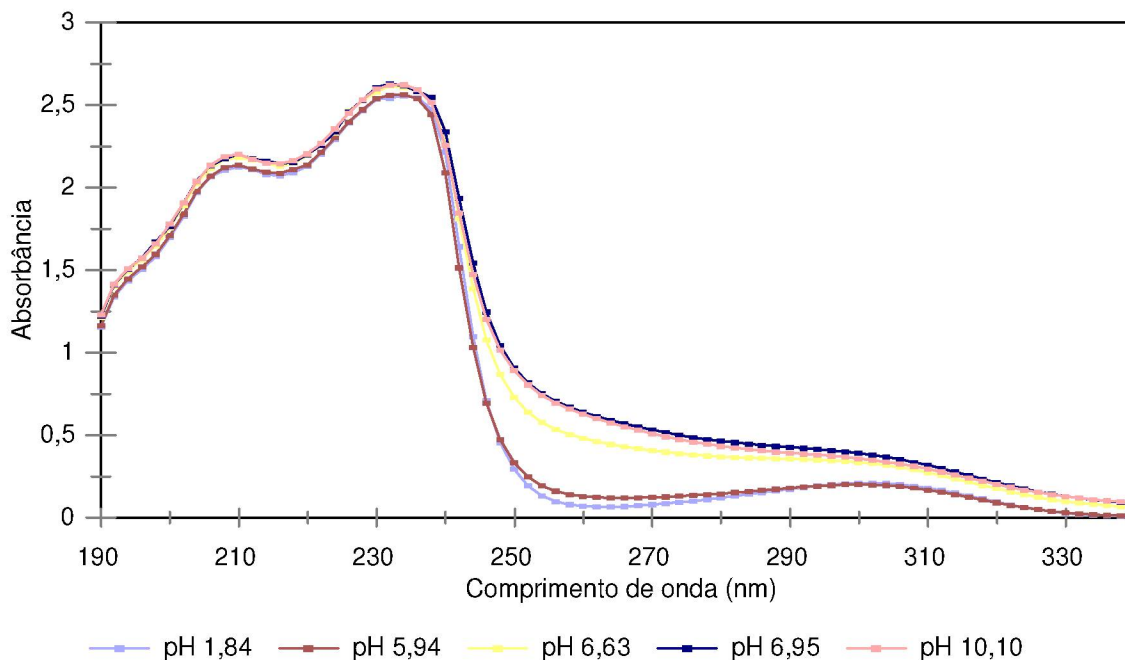
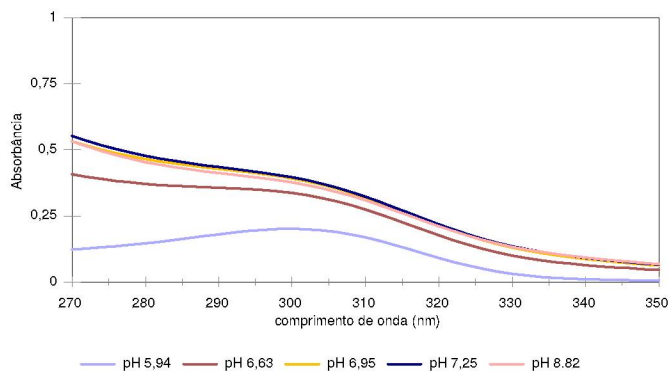
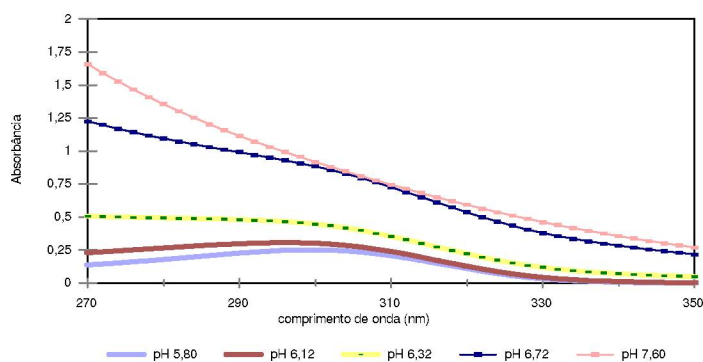


Figura 14 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico com o íon metálico Cu⁺² em concentração de 10⁻³ mol/L, proporção 1:1 e varredura de 190 a 330 nm.

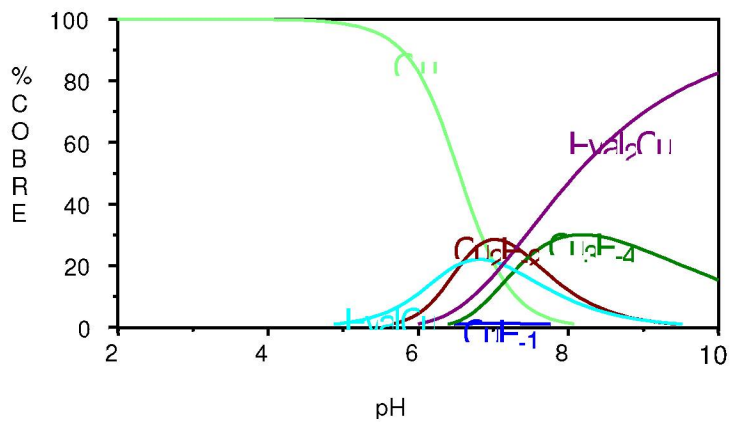
Na Figura 15 estão representados gráficos que mostram pontos isobésticos para o complexo formado entre o ácido hialurônico e o íon metálico cobre em comparação com os espectros do íon metálico puro. As faixas de pH foram escolhidas de acordo com o diagrama de especiação (seção titulação potenciométrica, página 18).



(a)



(b)



(c)

Figura 15 – Pontos isobésticos na região de 270 a 350 nm, para o sistema Hial-cobre(a) em comparação com a ausência nos espectros (b) cobre puro, de acordo com os resultados obtidos no diagrama de distribuição das espécies para Hial – cobre (c).

A Figura 16 apresenta os espectros na região do ultravioleta do íon metálico Zn^{+2} com concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram feitos na faixa de 190 a 390 nm com variação do pH da solução.

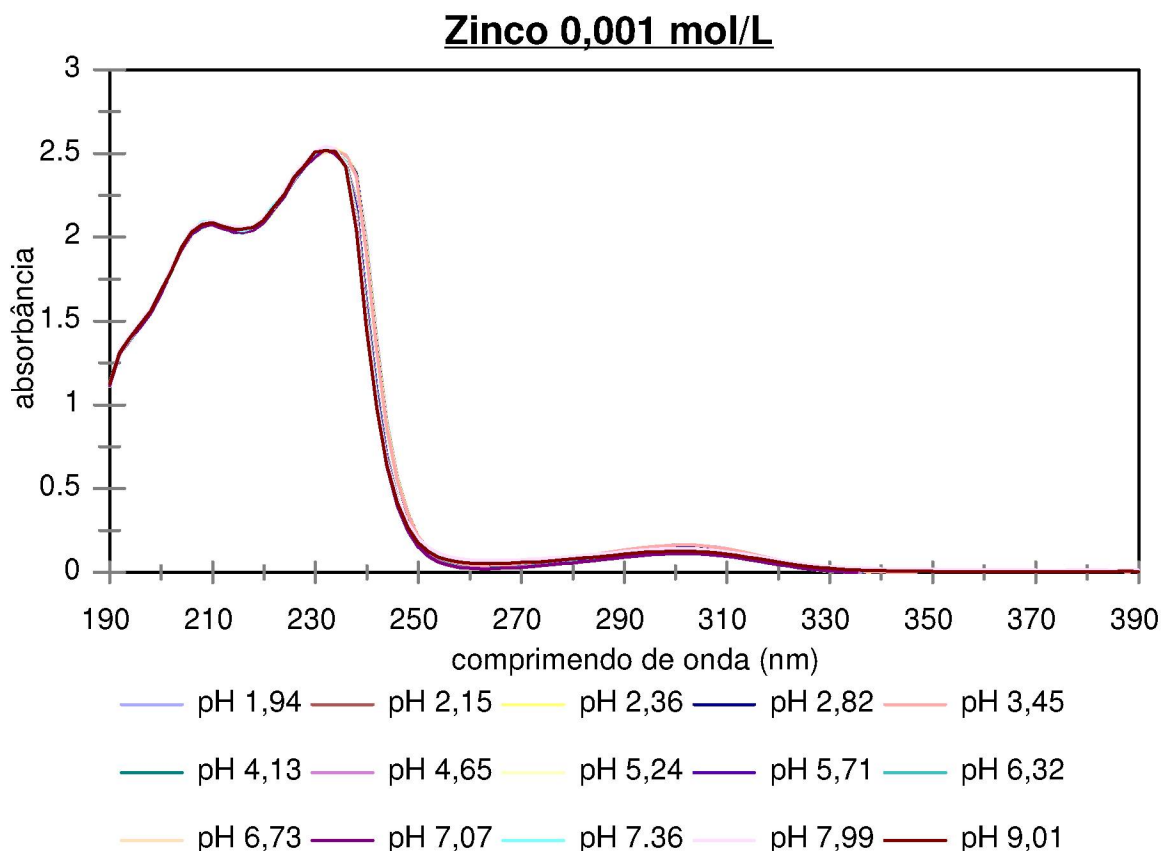


Figura 16 – Espectros de Ultravioleta para solução de zinco com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 390 nm.

Observa-se nos espectros do íon metálico Zn^{+2} que a variação do pH da solução não gera grandes variações nos picos máximos de absorção, o íon metálico zinco apresenta um comportamento regular em relação à variação de pH. É possível identificar também que as transições por transferência de carga são de baixa intensidade para este metal. A Figura 17 apresenta os espectros do íon metálico Zn^{+2} em quatro faixas diferentes de pH mostrando que em uma variação grande de pH de aproximadamente 2,0 a 9,0 não é possível perceber mudanças significativas de um espectro para o outro. Isto é esperado devido à configuração eletrônica (d^{10}) do metal.

Zinco 0,001 mol/L

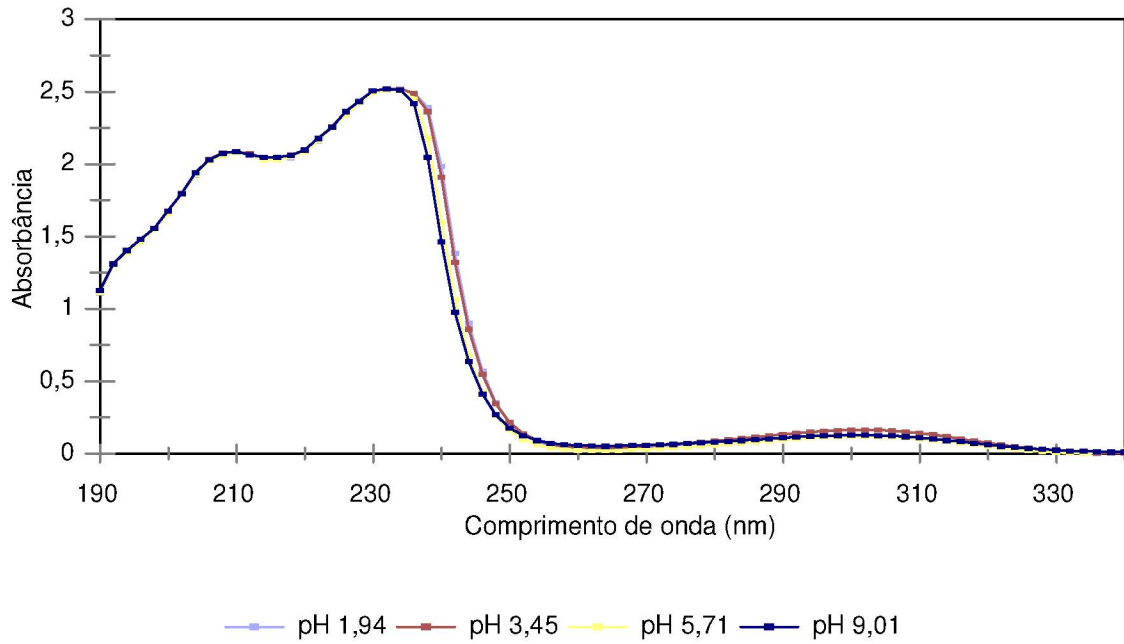


Figura 17 – Espectros de Ultravioleta para solução de zinco com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 330 nm.

A Figura 18 apresenta os espectros na região do ultravioleta de uma solução de Hial juntamente com o íon metálico Zn^{+2} com concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram feitos na faixa de 190 a 390 nm e a proporção ligante: metal foi de 1:1.

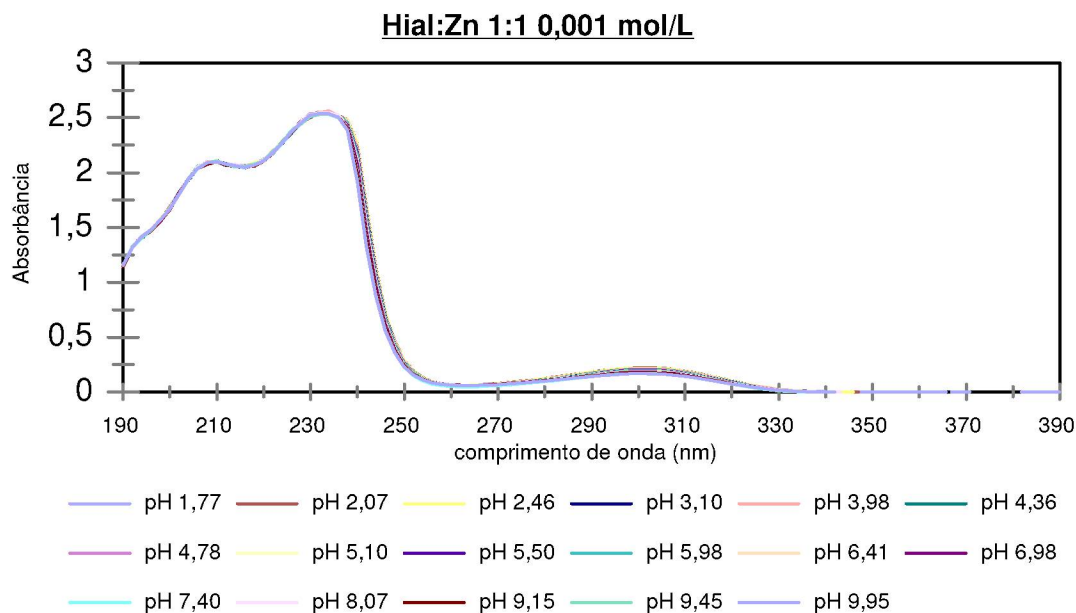
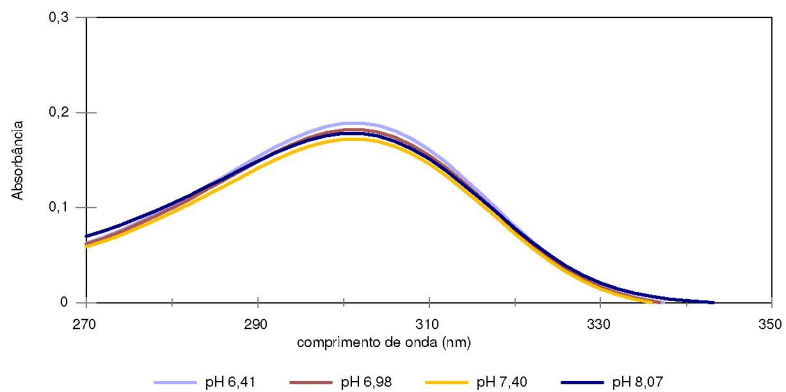


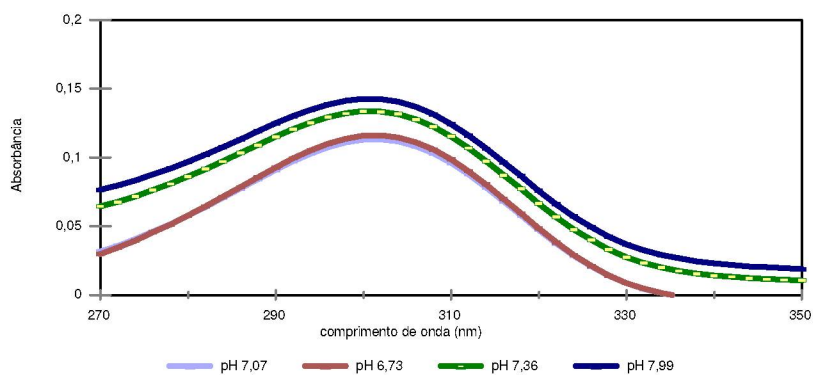
Figura 18 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico com o íon metálico Zn^{+2} em concentração de 10^{-3} mol/L, proporção 1:1 e varredura de 190 a 390 nm.

Analisando os espectros do íon metálico zinco e de sua associação com o ácido hialurônico, percebe-se pouca diferença entre ambos, no entanto é possível detectar uma diminuição discreta na intensidade da transição por transferência de carga. A variação do pH não apresentou diferenças significativas de máximos de absorção nos espectros, neste caso a técnica de Ultravioleta traz pouca contribuição a respeito da complexação do metal com o ácido hialurônico, por isso através da análise do diagrama de especiação tem-se uma melhor definição dos possíveis complexos formados, onde na faixa de pH entre 6,0 a 10,0, encontra-se a espécie ML e na faixa de pH entre 7,0 até valores superiores a 10,0 encontra-se a espécie ML_2 . Essas espécies encontram-se juntamente com alguns hidróxidos de zinco que se formam nestas mesmas faixas de pH, gerando assim uma competição entre hidróxidos e complexos.

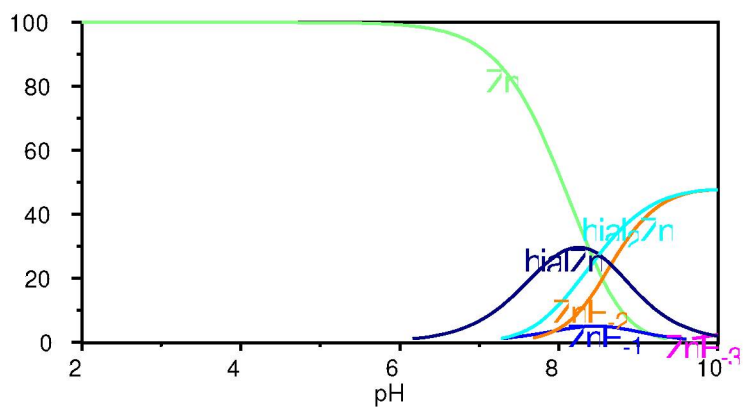
No entanto, a complexação entre Hial e zinco pode ser vista na Figura 19 onde estão representados pontos isobélicos do sistema ácido hialurônico e o íon metálico zinco. As faixas de pH foram escolhidas de acordo com o diagrama de especiação (seção titulação potenciométrica, página 18).



(a)



(b)



(c)

Figura 19 – Pontos isobásticos na região de 270 a 350 nm, para o sistema Hial-zinco (a) em comparação com a ausência nos espectros (b) zinco puro, de acordo com os resultados obtidos no diagrama de distribuição das espécies para Hial – zinco (c).

A Figura 20 apresenta os espectros na região do ultravioleta do íon metálico Gd^{+3} com concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram feitos na faixa de 190 a 390 nm com variação do pH da solução.

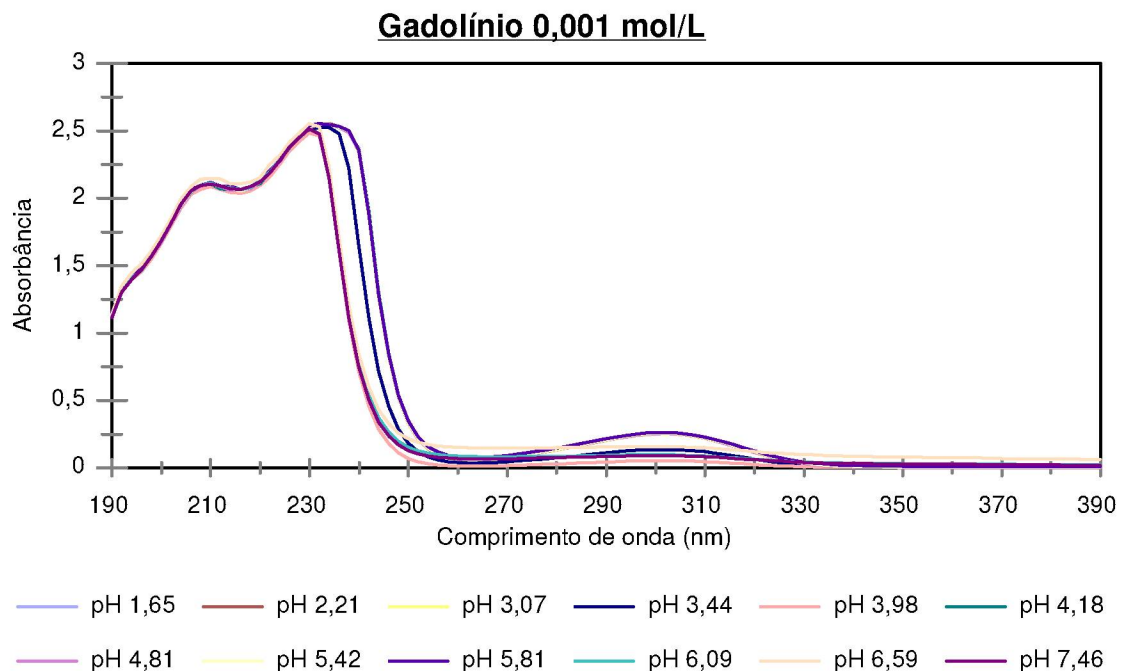


Figura 20 – Espectros de Ultravioleta para solução de gadolínio com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 190 a 390 nm.

Pode ser observado nos espectros da solução do íon metálico gadolínio a presença das transições por transferência de carga na região de 230 a 270 nm. Estas transições têm um aumento em sua intensidade à medida que o pH do equilíbrio é aumentado. No entanto, em pH maior do que 6,0 a intensidade destas absorções voltam a diminuir. Segundo o diagrama de especiação a formação de hidróxidos de gadolínio só inicia em valores de pH próximos a 10,0.

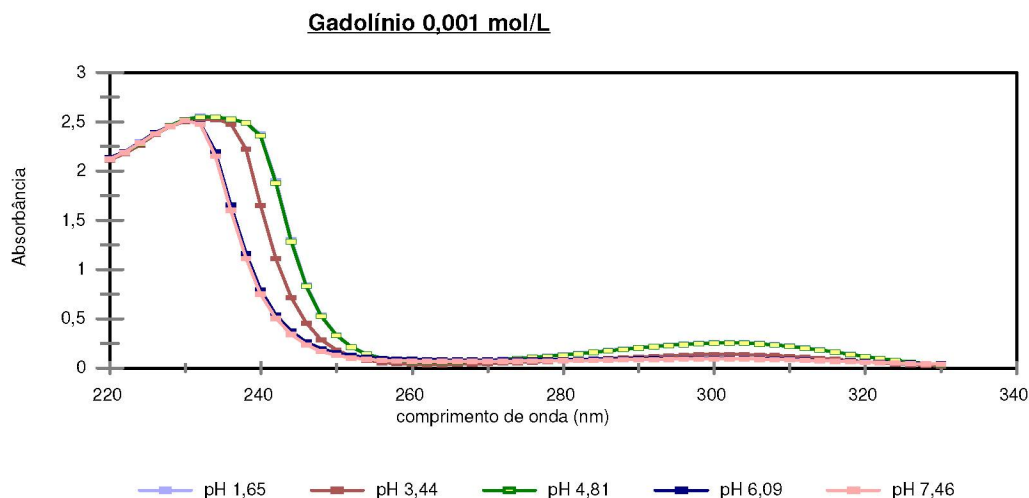


Figura 21 – Espectros de Ultravioleta para solução de gadolínio com concentração de 10^{-3} mol/L, varredura de 220 a 330 nm.

A figura 22 apresenta os espectros na região do ultravioleta de uma solução de Hial juntamente com o íon metálico Gd^{+3} com concentração de 10^{-3} mol/L. Os espectros foram feitos na faixa de 190 a 390 nm e a proporção ligante: metal foi de 1:1.

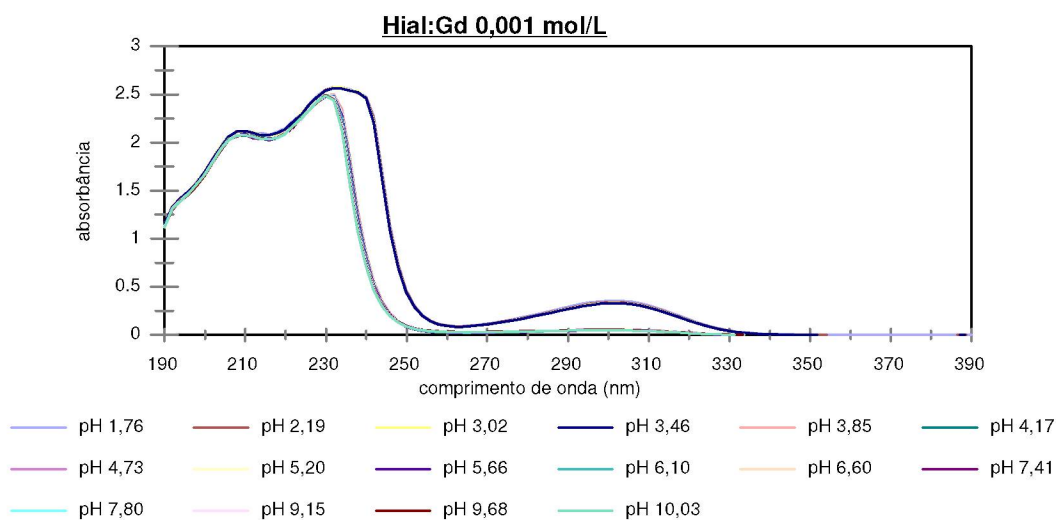


Figura 22 – Espectros de Ultravioleta para solução de ácido hialurônico com o íon metálico Gd^{+3} em concentração de 10^{-3} mol/L, proporção 1:1 e varredura de 190 a 390 nm.

Os espectros de ácido hialurônico com o íon metálico gadolínio apresentam algumas modificações em relação aos espectros de Hial e do íon gadolínio isoladamente. Observa-se uma redução na intensidade da absorção na região próxima a 300 nm. Os espectros apresentam variações nos máximos de absorção à medida que o pH da solução é aumentado. Na Figura 23 é possível observar que não existe alteração no espectro realizado a pH 4,0 em comparação com o espectro realizado a pH 10,0. Este comportamento pode ser explicado pela complexação do metal com o Hial, visto que através do diagrama de especiação os complexos de Hial: gadolínio se formam nas faixas de pH 2,0 a 10,0 (seção titulação potenciométrica, página 18).

Hial:Gd 0,001 mol/L

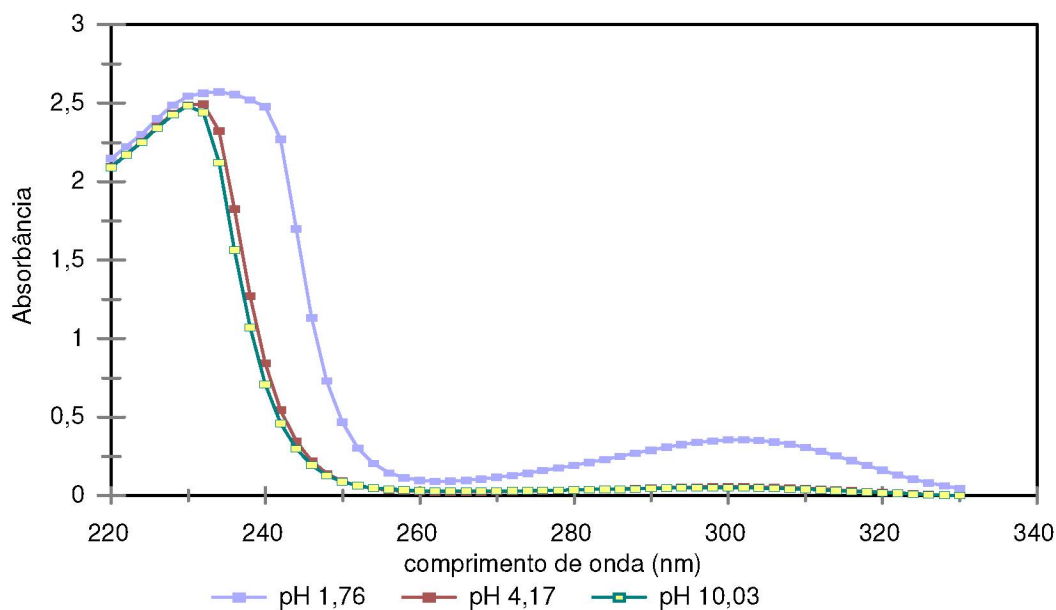
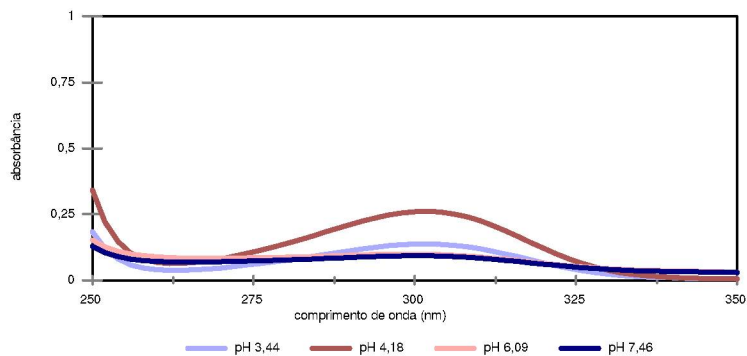
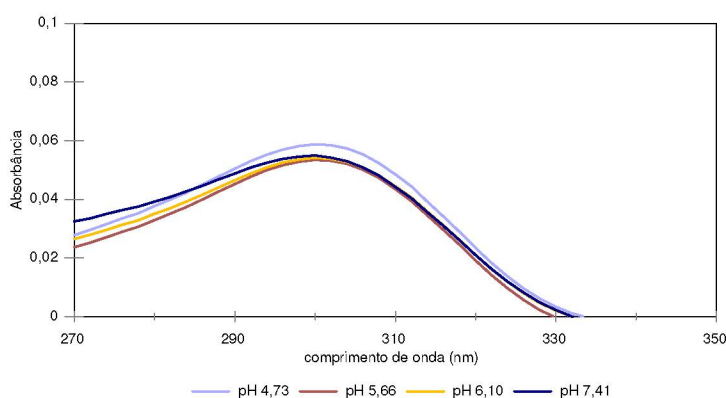


Figura 23 – Espectros de UV – Vis para solução de ácido hialurônico com o íon metálico Gd^{+3} em concentração de 10^{-3} mol/L, proporção 1:1 e varredura de 220 a 340 nm.

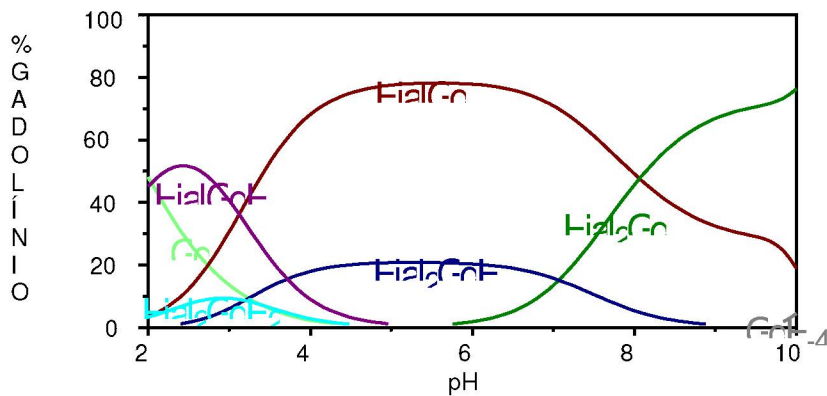
Na Figura 24 estão representados gráficos que mostram pontos isobésticos para o sistema entre o ácido hialurônico e o íon metálico gadolínio em comparação com os espectros do íon metálico puro. As faixas de pH foram escolhidas de acordo com o diagrama de especiação (seção titulação potenciométrica, página 18).



(a)



(b)



(c)

Figura 24 – Pontos isobécticos na região de 270 a 350 nm, para o sistema Hial-gadolínio (a) em comparação com a ausência nos espectros (b) gadolínio puro, de acordo com os resultados obtidos no diagrama de distribuição das espécies para Hial – gadolínio (c).

A espectroscopia de Ultravioleta foi utilizada com o intuito de monitorar a formação de espécies complexadas segundo o pH. A confirmação da formação dessas espécies pode ser observada pela variação no comprimento de onda e pela variação na intensidade dos máximos de absorção dos espectros. De modo geral, observou-se que na medida em que o pH da solução foi aumentado, as regiões de absorções por transferência de carga que são as regiões de interesse, diminuíram a intensidade de absorção, demonstrando que os elétrons responsáveis por essas transições não se encontram disponíveis. No caso do metal cobre a intensidade de absorção das bandas de transferência de carga aumentam com o aumento do pH, pois o cobre tende a formar espécies hidrolíticas que competem com a formação dos complexos. Foi possível perceber algumas diferenças nos espectros obtidos do material complexado em relação ao não complexado.

4.3. Espectrometria no Infravermelho

Para facilitar a interpretação dos gráficos de IR, todos os gráficos obtidos com os complexos, em faixas de pH determinadas, apresentam também o espectro do hialuronato de sódio. Na Figura 25 estão representados os espectros de infravermelho dos complexos sólidos obtidos com ácido hialurônico e o íon metálico cobre na proporção 2:1 com variação de pH entre 5,5 a 8,0.

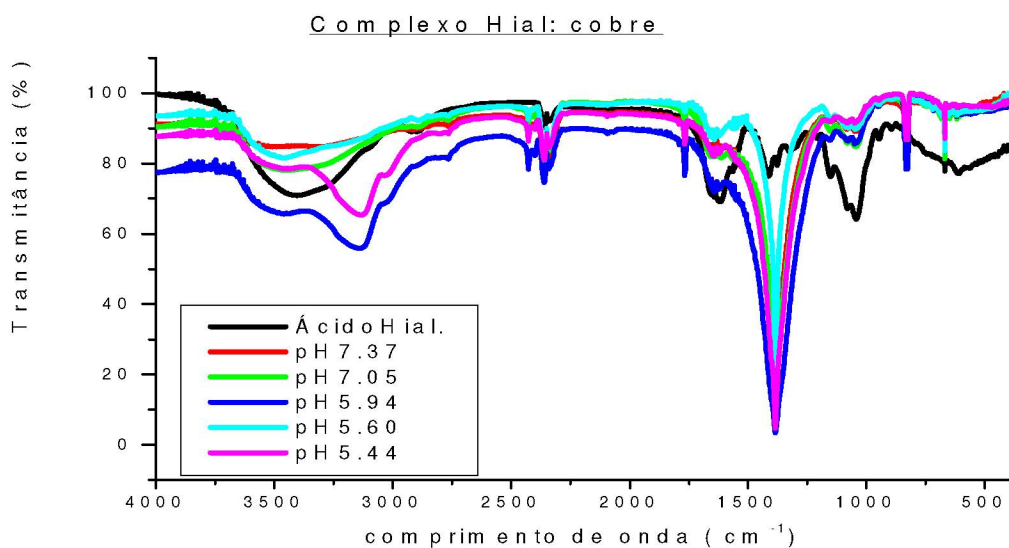


Figura 25 - Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico cobre, proporção 2:1 e faixa de pH de 5,0 a 8,0.

Devido às semelhanças entre as curvas em alguns valores de pH, fez-se uma separação de alguns espectros apresentados na Figura 26.

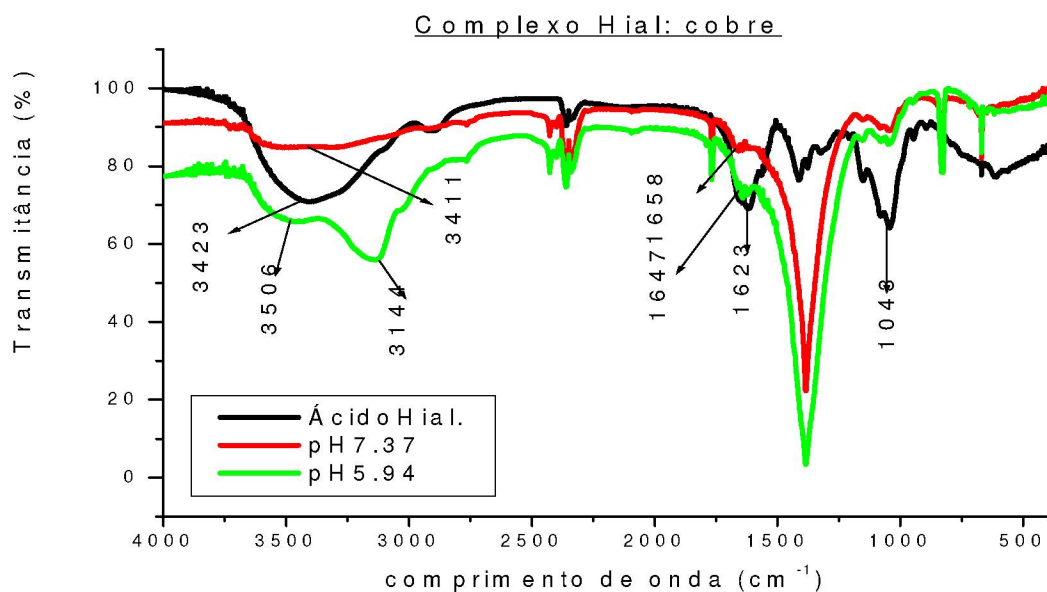


Figura 26- Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico cobre, proporção 2:1 e valores de pH de 5,94 e 7,37.

Pela observação dos espectros obtidos com complexos Hial – Cu⁺² em pH 5,94, apresenta um deslocamento significativo de suas bandas em relação ao hialuronato de sódio. Pode-se observar no espectro do hialuronato de sódio a presença de uma deformação axial de hidroxila livre muito larga na região de 3550 – 3200 cm⁻¹, característica de álcool e uma vibração de deformação axial do C – C – O na região de 1260 – 1000 cm⁻¹. Em relação à banda que aparece entre 3550 – 3200 cm⁻¹, o grande alargamento da banda é explicado pela sobreposição entre as bandas de OH e NH que se encontram na mesma faixa, praticamente. As bandas de NH se encontram entre as faixas de 3330 – 3060 cm⁻¹, proveniente de deformação axial assimétrica e simétrica. Observam-se também deformações características de ânion carboxilato, dando origem a duas bandas, uma das quais intensa e provém da deformação axial assimétrica, sendo observada na região de 1650 – 1550 cm⁻¹ e outra mais fraca que é observada em 1400 cm⁻¹, proveniente de deformação axial simétrica (31,33).

Nos espectros de Hial: Cu observa-se um leve deslocamento da banda na região de 1600 cm⁻¹ correspondente ao íon carboxilato. Observa-se também o aparecimento de duas bandas, uma em 3506 cm⁻¹ e a outra em 3144 cm⁻¹, isto pode ser explicado pela interação do metal com o ligante. Neste caso o metal se liga provavelmente ao grupo OH, pois tem -se uma diminuição na intensidade desta banda, sendo possível perceber também o surgimento de uma banda em frequência menor, justamente dentro da faixa onde se encontra a banda de NH. Observa-se também uma diminuição na intensidade da banda de C – C – O na região de 1043 cm⁻¹. Para o pH 7,37 tem -se um espectro semelhante ao obtido a pH 5,94 em algumas regiões: na região onde se encontra a sobreposição das bandas de hidroxila e amida há uma diminuição na intensidade destas bandas e se mantém o alargamento da região, provavelmente neste valor de pH o metal esteja complexado nos dois sítios possíveis de complexação. A Tabela 3 traz os dados dos espectros de infravermelho para o sistema Hial – Cu⁺².

Tabela 3 – Dados dos espectros de infravermelho para Hial – Na e Hial – Cu em relação ao pH 5,94.

Bandas	Hialuronato de sódio	Hial: Cu
Carboxilato Deformação axial Assimétrica	1623 cm ⁻¹	1647 cm ⁻¹
Deformação axial Simétrica e Assimétrica NH	3330 – 3060 cm ⁻¹ (31,33)	3144 cm ⁻¹
Hidroxila Deformação axial	3550 – 3200 cm ⁻¹ (31,33)	3506 cm ⁻¹

Na figura 27 estão representados os espectros de infravermelho dos complexos sólidos obtidos com ácido hialurônico e o íon metálico zinco na proporção 2:1 com variação de pH entre 6,0 a 8,0.

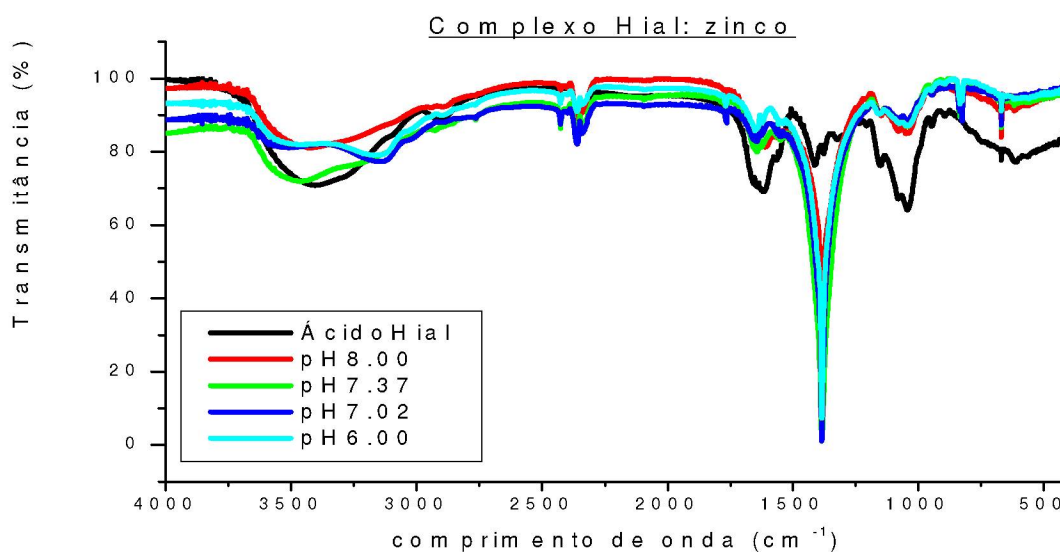


Figura 27- Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico zinco, proporção 2:1 e faixa de pH de 6,0 a 8,0.

Devido às semelhanças entre as curvas em alguns valores de pH, fez-se uma separação dos espectros apresentados para serem analisados. A Figura 28 apresenta os espectros nos valores de pH 7,02 e 8,00.

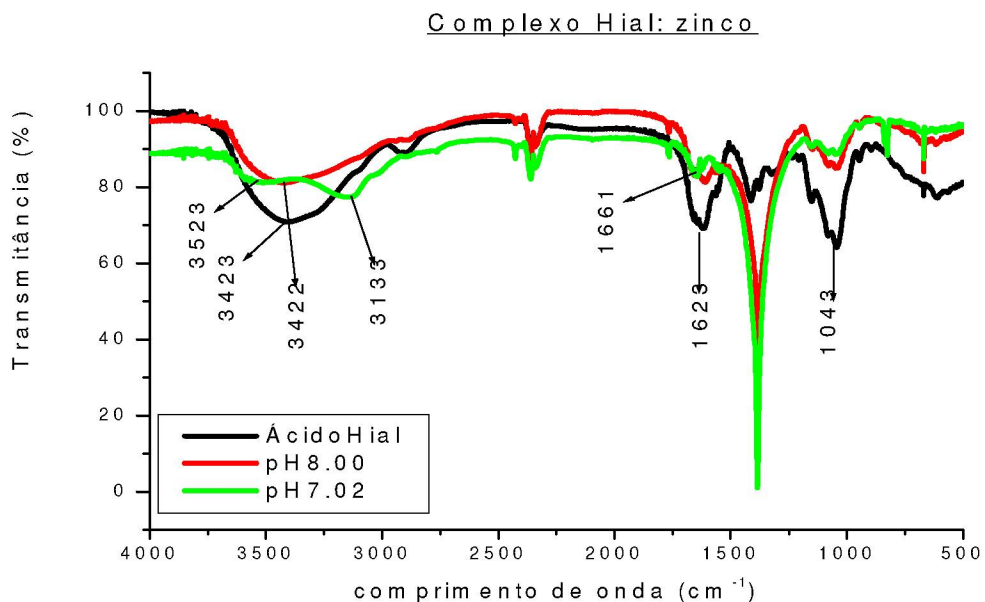


Figura 28 - Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico zinco, proporção 2:1 e pH de 7,02 a 8,00.

Nos espectros de Hial: Zn observa-se um comportamento parecido com o metal cobre. É possível observar uma diminuição na intensidade da banda de C – C – O na região de 1043 cm^{-1} . No pH 7,02 tem -se a separação entre as bandas na região compreendida entre 3550 a 3060, sendo que a de menor frequência corresponde a banda de NH em 3133 cm^{-1} e a de maior frequência corresponde a banda de OH em 3523 cm^{-1} . Este aspecto do espectro onde a banda de hidroxila diminui a intensidade e a banda de NH começa a aparecer no espectro, indicando que a complexação pode estar acontecendo entre o metal e a hidroxila. A Tabela 4 traz os dados dos espectros de infravermelho para o complexo formado entre o Hial e o metal zinco.

Tabela 4 – Dados dos espectros de infravermelho para Hial – Na e Hial – Zn

Bandas	Hialuronato de sódio	Hial: Zn
Carboxilato Deformação axial Assimétrica	1623 cm ⁻¹	1661 cm ⁻¹
Deformação axial Simétrica e Assimétrica NH	3330 – 3060 cm ⁻¹ (31,33)	1133 cm ⁻¹
Hidroxila Deformação axial	3550 – 3200 cm ⁻¹ (31,33)	3523 cm ⁻¹

Na Figura 29 estão representados os espectros de infravermelho dos complexos sólidos obtidos com ácido hialurônico e o íon metálico gadolínio na proporção 2:1 com variação de pH entre 5,0 a 9,0.

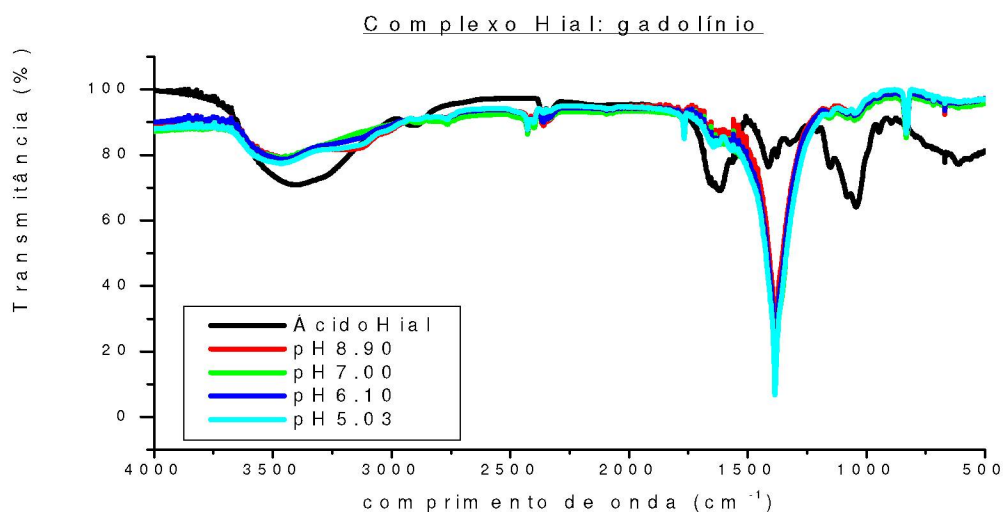


Figura 29 – Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico gadolínio, proporção 2:1 e faixa de pH de 5,0 a 9,0.

Devido às semelhanças entre as curvas em alguns valores de pH, fez-se uma separação dos espectros apresentados para serem analisados. A Figura 30 apresenta os espectros nos valores de pH 6,10 e 8,90.

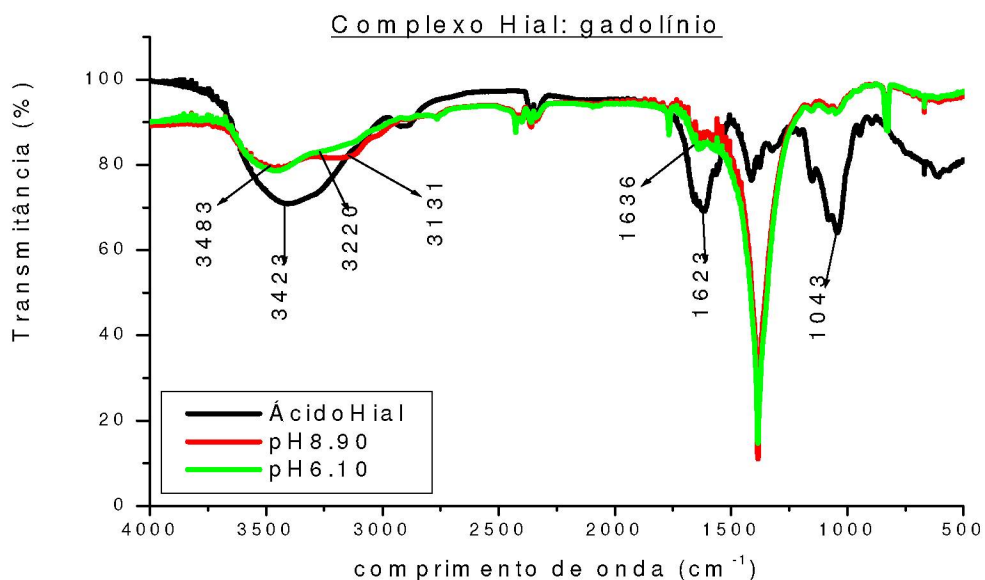


Figura 30 – Espectros de infravermelho dos complexos sólidos de ácido hialurônico com o íon metálico gadolínio, proporção 2:1 em pH 6,10 e 8,90.

Pela observação dos espectros é possível perceber que os espectros apresentados dos materiais com valores de pH de 6,10 e 8,90 apresentaram um deslocamento significativo de suas bandas em relação ao hialuronato de sódio.

Nos espectros de Hial: gadolínio observa-se o deslocamento da banda na região de 1600 cm⁻¹ correspondente ao íon carboxilato. Observa-se também um deslocamento das bandas de sobreposição nas regiões entre 3550 a 3060 cm⁻¹ referentes à hidroxila e amida. É possível observar também uma diminuição na intensidade da banda de C – C – O na região de 1043 cm⁻¹. Essas variações indicam que o metal gadolínio se liga preferencialmente ao carboxilato, porém pode estar havendo complexação também pelo grupo OH do álcool do carbono 6.

Os dados dos espectros de infravermelho para o complexo Hial – Gd³⁺ podem ser observados através da Tabela 5.

Tabela 5 – Dados dos espectros de infravermelho para Hial – Na e Hial – Gd

Bandas	Hialuronato de sódio	Hial: Gd
Carboxilato Deformação axial Assimétrica	1623 cm ⁻¹	1633 cm ⁻¹
Deformação axial Simétrica e Assimétrica NH	3330 – 3060 cm ⁻¹ (31,33)	3220 cm ⁻¹
Hidroxila Deformação axial	3550 – 3200 cm ⁻¹ (31,33)	3483 cm ⁻¹

Analisando os resultados das três técnicas utilizados no estudo, foi possível propor estruturas para os complexos do ácido hialurônico com os metais cobre, zinco e gadolínio. Nas Figuras 31, 32 e 33 está apresentada uma possibilidade de complexos formados para cada metal de estudo, levando em consideração que estas propostas não são as únicas possíveis em relação a cada metal, porém algumas possíveis.

4.4. Proposta das possíveis estruturas dos complexos formados

Estrutura proposta para o complexo formado entre o ácido hialurônico e o íon metálico cobre.

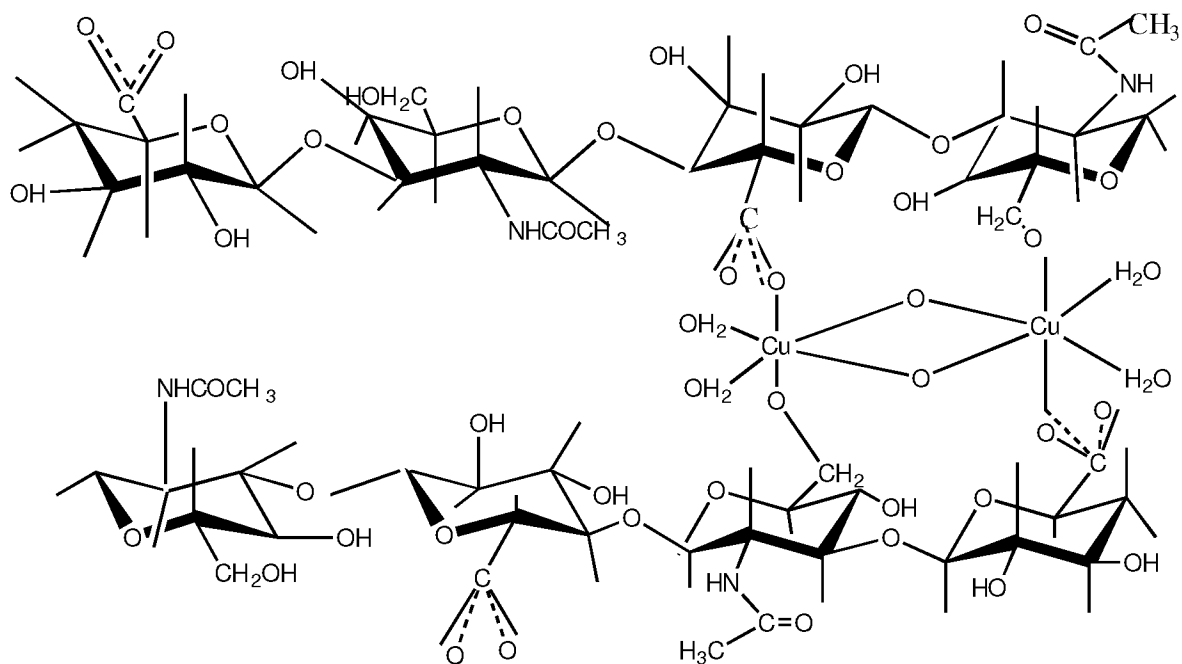


Figura 31. Complexo Hial:Cu

Estrutura proposta para o complexo formado entre o ácido hialurônico e o íon metálico zinco.

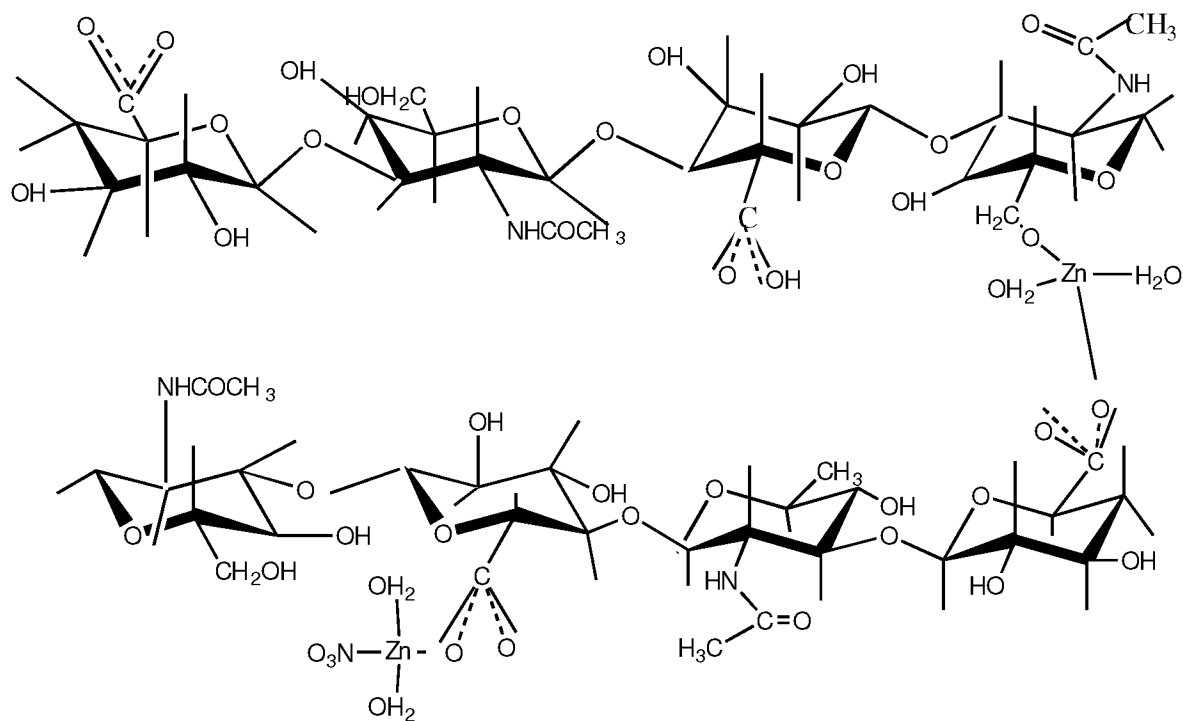


Figura 32. Complexo Hial:Zn

Estrutura proposta para o complexo formado entre o ácido hialurônico e o íon metálico gadolínio.

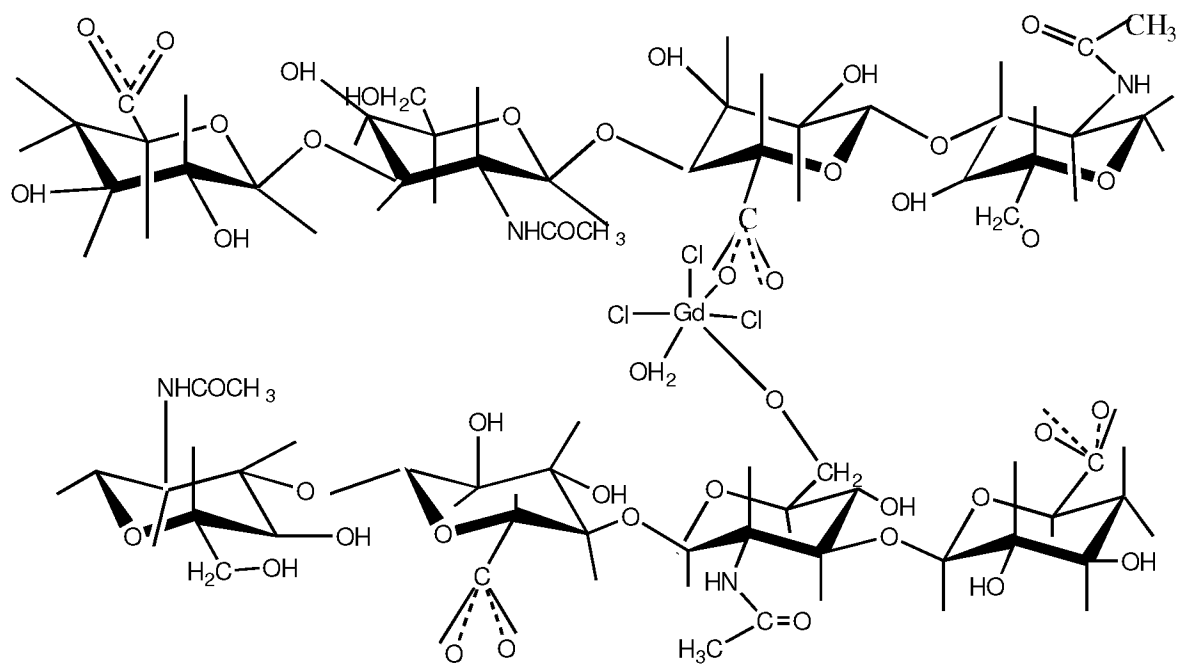


Figura 33. Complexo Hial:Gd

5. CONCLUSÕES

O uso da técnica de titulação potenciométrica é de grande importância na obtenção das constantes de protonação, complexação e dissociação, além de possibilitar também a obtenção dos diagramas de distribuição das espécies através da variação do pH.

Os valores das constantes e os dados obtidos na titulação potenciométrica passaram por etapas de refinamento de cálculo, através do programa computacional Best 7. Os resultados mostraram que para os três metais estudados a complexação acontece, sendo confirmada pelas diferenças entre as curvas de titulação do ácido hialurônico puro e as curvas de titulação entre os complexos do ácido hialurônico na presença de íons metálicos. No caso do metal gadolínio as espécies complexadas aparecem em toda faixa de pH estudada, ou seja, uma variação de pH de 2,0 até 10,0. Já para o metal zinco isto não acontece, as espécies complexadas só aparecem em valores de pH acima de 6,0 e para o metal cobre as espécies complexadas apareceram em valores de pH superiores a 5,0.

A espectroscopia de Ultravioleta possibilitou a monitoração da formação das espécies complexadas segundo a variação do pH. Isso é possível através a mudança observada no comprimento de onda e nos máximos de absorção nos espectros. Em geral, o deslocamento dos pontos máximos de absorção foi relacionado com a variação do pH: a medida que o pH da solução em equilíbrio aumentava, esses máximos de absorção deslocavam -se. Para o metal zinco os espectros de UV – Vis não apresentaram resultados significativos para essa análise, visto que os deslocamentos dos máximos de absorção foram praticamente insignificantes. Para os metais cobre e gadolínio, é visível o deslocamento dos pontos máximos de absorção através do aumento do pH. Essas variações indicam que mudanças acontecem com o sistema em equilíbrio durante a titulação na região do ultravioleta, indicando que uma possível complexação esteja acontecendo.

Quanto à técnica de espectrometria no infravermelho foi possível observar modificações nas bandas de IR, referente às regiões de hidroxila, amida e íon carboxilato. Essas mudanças são um indício de que os íons metálicos se complexaram com o ácido hialurônico nestas possíveis posições e que se mantiveram complexados no estado sólido. A confirmação desta complexação pode ser explicada através do deslocamento ou redução dessas bandas citadas, devido a variações significativas observadas nos espectros dos íons metálicos associados ao ácido hialurônico em relação ao espectro do hialuronato de sódio. De maneira geral pode-se afirmar que a espectrometria no infravermelho foi a ferramenta que mais trouxe contribuição na indicação da existência da complexação e onde essa complexação se deu. No caso do metal cobre os espectros demonstram que o metal está ligado provavelmente à hidroxila do carbono 6 e também ao grupo carboxilato, o metal zinco apresentou um comportamento similar ao do metal cobre. Para o metal gadolínio o sítio preferencial de ligação deste metal é o íon carboxilato, isto está relacionado à dureza do metal, o gadolínio é um metal duro e tende a se ligar com grupos carboxilatos (11,12). Porém a ligação através hidroxila também acontece.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Pirc, E.T., Arcon, I., Bukovec, P., Kodre, A., Carbohydrate Research 324 (2000) 275-282.
- (2) Azuma, N., Ikoma, T., Osaka, A., Tanaka, J., Materials Science and Engineering 24 (2004) 703-707.
- (3) Mercê, A.L.R., Carrera, L.C.M., Romanholi, L.K.S., Recio, M.A.L., J. Inorg. Biochem. 89 (2002) 212 - 218.
- (4) Toma, H.E., Química Bioinorgânica, Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 1984.
- (5) Burger, K., Illés, J., Gyurcsik, B., Gazdag, M., Forrai, E., Dékány, I., Mihályfi, K., Carbohydr. Res. 332 (2001) 197 - 207.
- (6) Mercê, A.L.R., Landaluze, J.S., Mangrich, A.S., Szpoganicz, B., Sierakowski, M.R., Biores. Tecnol. 76 (2001) 29-37.
- (7) Mensitieri, M., Ambrosio, L., Nicolais, L., J. Mater. Sci. Mater. Med. 7 (1996) 695-698.
- (8) Figueroa e col.; Biochem. and Biophys. Research Comm., 74(2), 406 (1975).
- (9) Nimrod e col.; United States Patent, 4, 784,991, Nov. 15 (1988).
- (10) Barbucci, R., Magnani, A., Lamponi, S., Mitola, S., Ziche, M., Morbidelli, L., Bussolino, F., J. Inorg. Biochem. 81 (2000) 229 -237.
- (11) Pearson, R.G., Science, vol. 151, 172 -176 (1966).
- (12) Pearson, R.G., J. Chem. Edu., vol. 45, (9) 581 - 586 (1968).
- (13) da Silva, J.J.R. Fraústo, The Biological Chemistry of the Elements: the Inorganic Chemistry of Life; Oxford University Press, 1991.
- (14) Graepi, N., et al, Inorg. Chim. Acta, 235, 311 (1995).
- (15) Lee, J. D., Concise Inorganic Chemistry, ed. Chapman & Hall, N. Y., 1997.
- (16) Thunus, L., Lejeune, R., Coordination Chemistry Reviews, Elsevier, 184 (1999) 125 – 155.
- (17) Ohlweiler, A.O., Química Analítica Quantitativa, 2a edição, LTC, 1980.
- (18) Noleto, G.R., Mercê, A.L.R., Iacomini, M., Gorin, P.A.J., Soccol, V.T., Oliveira, M.B.M., Mol. Cell. Biochem. 233:73-83; 2002.

- (19) Mercê, A.L.R., Lombardi, S.C., Mangrich, A.S., Reicher, F., Szpoganicz, B., Levy, N.M. and Felcman, J., J. Braz. Chem. Soc., 7 (4) (1996) 239 - 245.
- (20) Mercê, A.L.R., Fernandes, E., Mangrich, A.S., Sierakowski, M.R., Szpoganicz, B., J. Braz. Chem. Soc., 12 (6) (2001) 791-798.
- (21) Mercê, A.L.R., Fernandes, E., Mangrich, A.S., Sierakowski, M.R., J. Braz. Chem. Soc., 11(3) (2000) 224 -231.
- (22) Sala, O., Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho, Unesp editora, 1996.
- (23) Schwarzenbach, G., Flaschka, H., in: Complexometric Titrations, Methuen, Bungay, UK, 1969, p. 241.
- (24) Martell, A.E., Smith, R.M., NIST Critical Constants of Metal Complexes, Version 6.0, Database 46, Gaithersburg, MD, USA, (2001).
- (25) Mercê, A.L.R., Lombardi, S.C., Mangrich, A.S., Reicher, F., Szpoganicz, B., Sierakowski, M.R., Carbohydrate Polymers 35 (1998) 13-20.
- (26) Lombardi, S.C., Mercê, A.L.R., Bioresouce Technology 89 (2003) 63-73.
- (27) Mercê, A.L.R., Landaluze, J.S., Mangrich, A.S., Szpoganicz, B., Sierakowski, M.R., Bioresouce Technology 76 (2001) 29-37.
- (28) Martell, A.E. and Motekaitis, R.J. The Determination and Use of Stability Constants, 2 nd ed., VCH, N.Y., 1992.
- (29) Baes, Jr., C.F., Mesmer, R.E., The Hydrolysis of Cations, N.Y., Wiley & Sons, 1976, 121, 274, 365.
- (30) Skoog, A.D., West, D.M. and Holler, F.J., Fundamentals of Analytical Chemistry, 7 th edition, Saunders College Publishing, 1991, p. 386 – 430, 497 – 526, 557 – 600.
- (31) Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morrill, T.C., Spectrometric Identification of Organic Compuonds, 5 th ed., chapter 3 and 7, N.Y., Wiley, 1991.
- (32) Lever, A.B.P., Inorganic Eletronic Spectroscopy, Elsevier, N.Y., 1968, p. 173, 480-481, 553-556.
- (33) Conley, Robert T., Infrared Spectroscopy, second edition, Allyn and Bacon, Inc., United States of America, 1972.