

MARCELA GUIOTOKU

**ESTUDO DOS EQUILÍBRIOS DE
MONOSSACARÍDEOS COM OS
ÍONS VANADILA(IV) E ZINCO(II)
EM SOLUÇÃO AQUOSA**

Florianópolis - SC

2002

MARCELA GUIOTOKU

**ESTUDO DOS EQUILÍBRIOS DE
MONOSSACARÍDEOS COM OS
ÍONS VANADILA(IV) E ZINCO(II)
EM SOLUÇÃO AQUOSA**

Dissertação submetida ao Curso de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis - SC

2002

*Ao Marcos, por tudo
que vivemos e ainda
viveremos juntos.*

Agradecimentos

- ↗ Ao professor Bruno Szpoganicz pela possibilidade da realização deste trabalho, por toda sua dedicação, paciência, amizade e bom humor.
- ↗ Ao professor Juan M. S. Peregrin pela atenção a mim dedicada e pela contribuição nas medidas de RPE.
- ↗ À professora Fátima Regina Mena B. Silva pela possibilidade da realização dos testes biológicos e discussão dos resultados.
- ↗ À Eliandra pela amizade, atenção e imensa colaboração nos testes biológicos.
- ↗ À todos professores, amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
- ↗ Ao pessoal do Laboratório 311 pelos bons momentos que passamos juntos.
- ↗ Em especial às minhas amigas Vívian, Maurícia (Mauri), Lúcia (Darling) e Domingas pelas provas de amizade dadas em todos os momentos.
- ↗ Ao Marcos por toda compreensão, amor e carinho.
- ↗ À toda minha família.
- ↗ À Deus por estar sempre presente ao meu lado.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1 Vanádio.....	1
I.1.1 Complexos de vanádio como mimético da Insulina.....	2
I.2 Zinco.....	6
I.3 Complexos de metais de transição com açúcares.....	8
I.4 Estudo em solução.....	10
I.4.1 Titulação potenciométrica.....	10
I.4.2 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.....	11
II – OBJETIVOS.....	12
II.1 Objetivos gerais.....	12
II.2 Objetivos específicos.....	13
III – PARTE EXPERIMENTAL.....	15
III.1 Materiais.....	15
III.2 Métodos.....	17
III.2.1 Estudo potenciométrico.....	17
III.2.2 Estudo de RPE.....	18
III.2.3 Ensaio biológicos.....	19

III.2.3.1	Animais diabéticos induzidos com aloxana.....	19
III.2.3.2	Tratamento com o complexo HGli-VO.....	20
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		22
IV.1	Potenciometria.....	22
IV.1.1	Estudo dos equilíbrios dos açúcares com o oxocátion VO^{2+}	22
IV.1.2	Estudo dos equilíbrios dos açúcares com o íon Zn^{2+}	36
IV.2	Estudo de RPE.....	49
IV.3	Testes biológicos.....	51
IV.3.1	Estudo via intraperitonal.....	52
IV.3.2	Estudo via oral.....	54
V – CONCLUSÕES.....		56
VI – BIBLIOGRAFIA.....		58

Lista de Símbolos e Abreviaturas

a	mmol de KOH / mmol de ligante
Ar	Argônio
BaCl ₂	Cloreto de bário
BaSO ₄	Sulfato de bário
dGli	2-deoxi-D-Glicopirranose
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
Galac	D-Galactono-1,4-lactona
HCl	Ácido clorídrico
HGli	ácido D-Glicônico (sal potássico)
KCl	Cloreto de potássio
i. p.	Intraperitonal
KMnO ₄	Permanganato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
μ	Força iônica
OMS	Organização Mundial de Saúde
Riblac	D-Ribono-1,4-lactona
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
S.E.M.	Standard error mean (desvio médio padrão)
STZ	Streptozocin
T	Temperatura
VOSO ₄	Sulfato de vanadila
ZnCl ₂	Cloreto de Zinco

Lista de Figuras

1	Diferentes estruturas químicas para o vanádio (IV) e (V).....	2
2	Monossacarídeos estudados neste trabalho.....	14
3	Sistema utilizado na titulação potenciométrica.....	17
4	Representação do sistema utilizado para as medidas de EPR.....	19
5	Curvas de equilíbrio potenciométrico do açúcar ác. D-Glicônico na ausência e na presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....	24
6	Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar D-Galactono-1.4-lactona em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....	25
7	Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar D-Ribono-1,4-lactona em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....	26
8	Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar 2-deoxi-D-Glicopirranose em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$. M (KCl).....	27
9	Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-HGli, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, HL é a espécie totalmente protonada do ligante e VOL representa o complexo normal. $VOH_{-1}L$, $VOH_{-2}L$, $VOH_{-3}L$ e $VOH_{-4}L$ são as formas mono-, di-, tri- e tetra- desprotonadas e $VO_2H_{-5}L_2$ representa a espécie dinuclear do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.....	30

- 10 Espécies VOH_2L e $\text{VO}_2\text{H}_5\text{L}_2$ formadas entre o ligante HGli e o íon vanadila.....31
- 11 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema [VO-Galac], na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: [VO] é o íon livre aquoso, [L] é a espécie totalmente protonada do ligante. $[\text{VOH}_{-1}\text{L}]$ e $[\text{VOH}_{-2}\text{L}]$, são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$ e $\mu = 0,100$ M.....33
- 12 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-Riblac, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, L é a espécie totalmente protonada do ligante. VOH_{-1}L e VOH_{-2}L , são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$ e $\mu = 0,100$ M.....34
- 13 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-dGli, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, L é a espécie totalmente protonada do ligante. VOH_{-1}L e VOH_{-2}L , são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, $T = 25^\circ\text{C}$ e $\mu = 0,100$ M.....35
- 14 Curvas de equilíbrio potenciométrico do açúcar ác. D-Glicônico na presença e na ausência do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....37
- 15 Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar D-Galacto-1,4-lactona em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....38
- 16 Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar Riblac em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl).....39

- 17 Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar dGli em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$ (KCl).....40
- 18 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema Zn-HGli, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso, HL é a espécie totalmente protonada do ligante e ZnL representa o complexo normal. $ZnH_{-1}L$, $ZnH_{-2}L$ e $ZnH_{-3}L$ são as formas mono-, di- e tri-desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3} M$, $T = 25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$44
- 19 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema Zn-Galac, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. $ZnH_{-2}L$ e $ZnH_{-3}L$ são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3} M$, $T = 25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$45
- 20 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema Zn-Riblac, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. $ZnH_{-2}L$ e $ZnH_{-3}L$ são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3} M$, $T = 25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$46
- 21 Curva de distribuição das espécies formadas no sistema Zn-dGli, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. $ZnH_{-2}L$ e $ZnH_{-3}L$ são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3} M$, $T = 25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$47

22	Espectro de RPE do complexo VO-HGli, onde (I) p[H] 2,8, (II) p[H] 13,0, na razão 1:1 (M:L) em temperatura ambiente e concentração $1,0 \times 10^{-2}$ M.....	50
23	Efeito agudo do complexo HGli-VO via intraperitonal na glicemia em ratos diabéticos.....	52
24	Efeito agudo do complexo HGli-VO via oral na glicemia em ratos diabéticos.....	54

Lista de Tabelas

1	Complexos de VO^{2+} em diferentes modos de coordenação com potencial mimético da insulina.....	5
2	Complexos de zinco com efeito hipoglicemiante.....	7
3	Valores de log K para os equilíbrios de complexação do açúcar HGli com o íon vanadila, a 25°C e $\mu = 0,100$ M.....	23
4	Valores de log K para os equilíbrios de complexação dos ligantes Galac, Riblac e dGli com o íon VO^{2+} a 25°C e $\mu = 0,100$ M.....	28
5	Valores de log K para os equilíbrios de complexação do ligante HGli com o íon Zn^{2+} a 25°C e $\mu = 0,100$ M.....	41
6	Valores de log K para os equilíbrios de complexação dos ligantes Galac, Riblac e dGli com o íon Zn^{2+} a 25°C e $\mu = 0,100$ M.....	42
7	Efeito agudo do complexo HGli-VO em ratos diabéticos induzidos com aloxana.....	51

RESUMO

Neste trabalho estudou-se os equilíbrios de protonação e complexação entre monossacarídeos (ác. D-Glicônico (sal potássico), D-Galactono-1,4-lactona, D-Ribono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-Glicopiranosose) e os íons vanadila(IV) e zinco(II) em solução aquosa. Os complexos formados foram caracterizados por titulação potenciométrica e RPE. O sistema ác. D-Glicônico-VO foi testado quanto à sua ação hipoglicêmica em ratos diabéticos induzidos com aloxana. Os resultados obtidos através da titulação potenciométrica mostraram que para os açúcares de cadeia fechada (Galac, Riblac e dGli) os complexos formados com ambos os metais eram mononucleares e demonstraram efeito quelante mais fraco do que para o açúcar de cadeia aberta. Uma única espécie dinuclear foi detectada e é formada pela coordenação de duas moléculas do HGli a dois íons vanadila através de uma ponte hidróxida. As espécies mononucleares formadas por este açúcar com o oxovanádio (IV) também pôde ser confirmada pela medida de RPE, pois o espectro obtido apresentou apenas 8 linhas ($l=7/2$), típico de complexos VO-hexoses mononucleares. Os testes biológicos realizados em ratos com este açúcar complexado ao íon vanadila, tanto via intraperitoneal (i. p.) quanto oral, apresentaram efeito hipoglicêmico de 23% (via i. p.) e 18% (via oral), porém, este efeito se mostrou mais prolongado através da administração via i. p.. Sugere-se que o possível mecanismo de ação deste complexo seja por meio da captação da glicose pelo tecido muscular.

ABSTRACT

In this work the study of protonation and complexation equilibria of monosaccharides with vanadyl ion and zinc(II) ion in aqueous solution was carried out. The complexes formed were characterized by potentiometric titrations and EPR. The system of D-Gluconic acid and oxovanadium (IV) (Hgli-VO) was tested for its hypoglycemic action on diabetic rats induced by alloxana. The potentiometric titrations results showed that cyclic sugars form mononuclear complexes with both metals and demonstrated less binding degree than for that open chain sugar complexes. Only one binuclear species was detected and its formed by coordination of two molecules of Hgli and two of vanadyl ions via hydroxide bridge. The mononuclear species formed by Hgli with oxovanadium (IV) were confirmed by EPR technique, the spectra showed only 8 lines ($I=7/2$) characteristic for mononuclear VO-hexoses. Biological tests with rats using this sugar complex with vanadyl ion either via intraperitoneal or oral presented the hypoglycemic effect of 23% (via i. p.) and 18% (via oral). This effect was demonstrated to be more durable through i.p. administration. It was suggested that the possible mechanism of action of this complex is due to the capture of glucose by muscular tissue.

I - INTRODUÇÃO

I.1 Vanádio

Nas últimas décadas a bioquímica do vanádio tem atraído grande interesse, particularmente em estudos relacionados à sua acumulação em certos animais marinhos como os tunicatos, descoberto por HENZE¹ em 1911 e em cogumelos como a *Amanita muscaria*².

A essencialidade, distribuição e toxicologia do vanádio bem como sua atividade farmacológica são áreas de pesquisa em grande destaque atualmente. Embora várias funções bioquímicas e fisiológicas tenham sido sugeridas, o mecanismo de ação do vanádio ainda não está claramente definido. Através de estudos recentes, a melhor evidência da função biológica do vanádio é obtida através da bactéria *Azotobacter* e de plantas como algas e líquens³.

Do ponto de vista fisiológico o vanádio é um elemento traço importante, podendo ser encontrado em mamíferos e plantas numa concentração que varia de 10^{-9} a 10^{-6} M. Entre os biometais, o vanádio assume uma posição de destaque pois pode participar de processos biológicos em ambas as formas, aniônica e catiônica. Na sua forma aniônica o vanadato (V) assemelha-se ao fosfato, na forma catiônica principalmente como íon vanadila (VO^{+2}) e algumas vezes como V(III), o vanádio se comporta como um típico metal de transição, competindo com outros cátions metálicos na coordenação de ligantes.

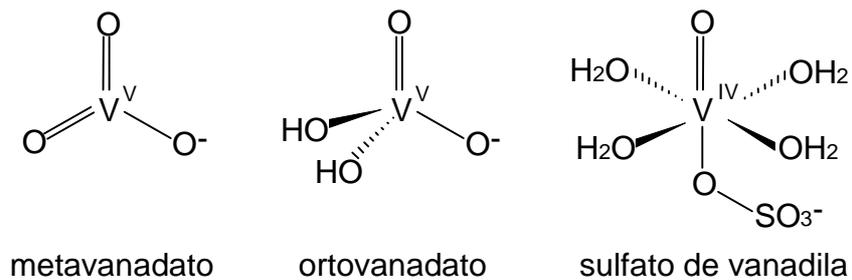


Figura 1 - Diferentes estruturas químicas para o vanádio (IV) e (V)⁴.

Esta facilidade na mudança do estado de oxidação e as características diferenciadas são responsáveis pela maioria dos estudos realizados com este metal^{5, 6, 7}.

Pesquisas mais recentes sugerem a participação do vanádio em várias funções biológicas como a alteração na atividade de algumas enzimas e também se discute a sua possível presença em hormônios, ossos, tecidos, rins, fígado, baço e no metabolismo da glicose e lipídeos^{8, 9}.

I.1.1 Complexos de vanádio como mimético da Insulina

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), a *Diabetes mellitus* é uma doença que acomete milhões de pessoas de diferentes faixas etárias, em todas as partes do mundo e infelizmente este número vem crescendo a cada dia^{10, 11}.

Esta doença é caracterizada pela hiperglicemia crônica causada pela absoluta ou relativa insuficiência da secreção e/ou ação da insulina que provoca distúrbios no metabolismo de açúcares, proteínas e lipídeos. Entretanto, outras complicações secundárias podem ocorrer às pessoas que

sofrem de Diabetes como arteriosclerose, microangiopatias, desordens oculares, disfunções renais e cardíacas^{11, 12}.

Clinicamente, existem duas variações na forma de como a Diabetes pode ser diagnosticada: a primeira delas é a chamada Diabetes do tipo I, que caracteriza-se pela ausência da secreção de insulina devido à destruição parcial ou total das células β -pancreáticas. A segunda é a chamada Diabetes do tipo II que pode ser caracterizada por duas anomalias fundamentais: uma é a diminuição na habilidade dos tecidos periféricos em responder à insulina (o que é denominado resistência à insulina), e a outra é a deficiência funcional das células β -pancreáticas em secretar a insulina, resultando numa hiperglicemia duradoura^{12, 13}.

Para o tratamento terapêutico da Diabetes do tipo II, diversos fármacos utilizando sulfonilureas, sulfonamidas e triglidazona (CS045) tem sido pesquisados¹⁴. Porém, a Diabetes do tipo I só pode ser controlada através de injeções diárias de insulina, pois esta não é ativa quando ingerida por causa da hidrólise que esse hormônio sofre no trato estomacal. Desta forma, o desenvolvimento de compostos que apresentem baixa toxicidade e que possam substituir a insulina ou mimetizar sua ação quando administrado oralmente é de grande interesse e importância.

As qualidades desejáveis para que um composto seja utilizado como agente farmacêutico inclui: carga neutra, baixo peso molecular, estabilidade termodinâmica e hidrolítica, disponibilidade para absorção via oral e, quando possível, capacidade bi-funcional⁸. Poucos íons metálicos apresentam atividade e facilidade no mecanismo de transporte, com exceção aos metais essenciais como Cobre, Zinco e Ferro.

Recentemente demonstrou-se através de testes biológicos que a administração oral de alguns compostos como o sulfato de vanadila (VOSO_4) e um pequeno número de complexos de vanádio (IV e V) na dieta de ratos diabéticos demonstravam ação semelhante à da insulina, porém seu mecanismo ainda não está elucidado^{7, 15}.

Sugere-se que o tratamento da Diabetes que utiliza o vanádio como um agente mimético da insulina, está apoiado na ação deste metal na enzima Na^+ , K^+ ATPase e no estímulo do transporte e oxidação da glicose⁵.

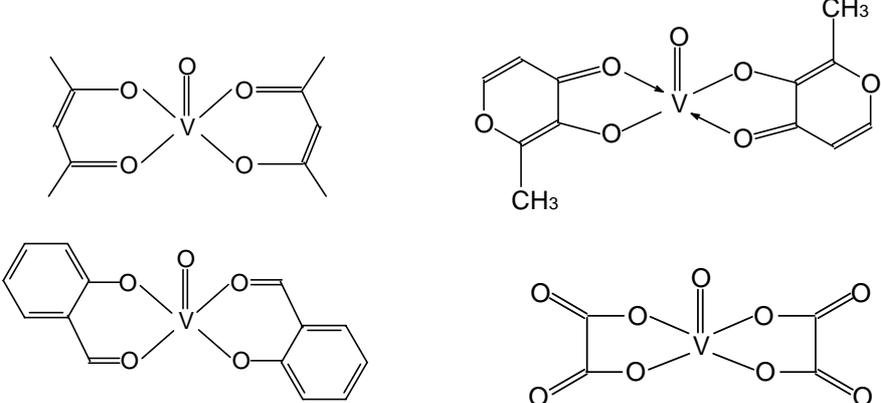
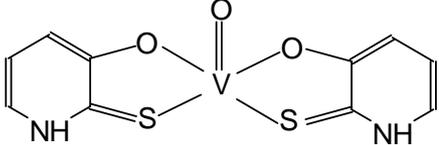
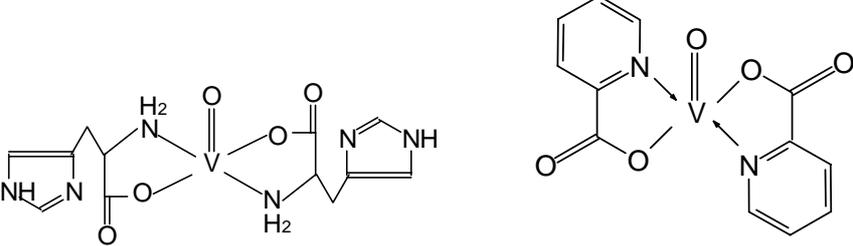
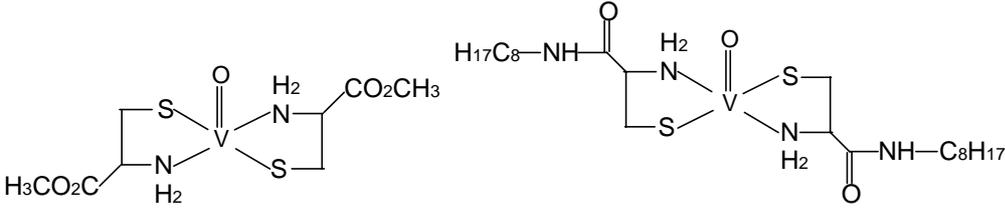
Os primeiros estudos com respeito à ação de compostos de vanádio como mimético da insulina ocorreram por volta de 1985, quando HEYLIGER et al.¹⁶ demonstraram que a administração oral de vanadato a ratos diabéticos tratados com streptozocin (ratos STZ) como modelos de diabetes do tipo I, abaixava os níveis de glicose no sangue até valores normais.

Em 1990 surgiu a primeira proposta de um complexo utilizando vanádio(IV), (cisteína-metil-éster)oxovanádio(IV), cujos resultados apresentados normalizaram as taxas de glicose em ratos diabéticos induzidos (ratos STZ) quando administrados oralmente¹⁷.

Com base nestes resultados diversos cientistas têm tentado desenvolver complexos miméticos da insulina mais ativos e com baixa toxicidade utilizando vanádio na forma de oxocátion (VO^{+2}).

Diferentes tipos de coordenação com o íon vanadila estão sendo estudados^{17, 18}:

Tabela 1 - Complexos de VO^{2+} em diferentes modos de coordenação com potencial mimético da insulina.

Modo	Complexo
O_4	
S_2O_2	
N_2O_2	
N_2S_2	

Fonte: adaptado de SAKURAI, H. et al.¹⁸.

I.2 Zinco

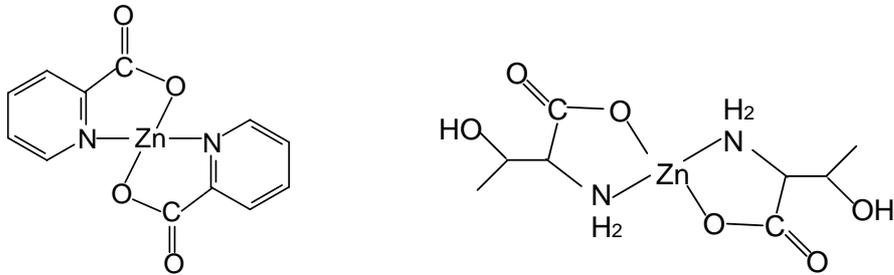
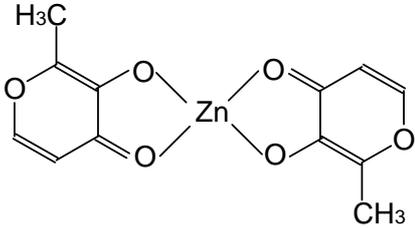
O zinco é um metal traço essencial em muitos processos biológicos e está associado à estrutura de proteínas, enzimas e outras moléculas desempenhando importantes funções, como a catálise específica de reações bioquímicas. Nos homens o ferro é o metal presente em maior quantidade por peso corporal, por exemplo um homem de 70 kg possui aproximadamente 4,1 g de ferro; o zinco aparece em segundo lugar com cerca de 2,3 g e o cobre com cerca de 0,2 g¹⁹.

Algumas enzimas envolvidas em reações de hidrólise contém zinco, um exemplo é a carboxipeptidase A, uma enzima que catalisa especificamente a hidrólise da ligação peptídica carboxi-terminal e a anidrase carbônica, responsável pela hidrólise do dióxido de carbono²⁰.

Em humanos e animais, a deficiência de zinco causa perda de apetite, anomalias no esqueleto e cabelos, lesões na pele e inibição da maturação sexual. Diversos estudos sugerem que o nanismo em pré-adolescentes possa ser atribuído à falta de zinco, embora outros fatores nutricionais poderiam também contribuir para estes resultados. Em alguns casos, detectou-se que a deficiência de zinco poderia ter causado graves anormalidades no paladar e olfato de humanos. A função do zinco na cicatrização de feridas também têm atraído muita atenção, já que este metal inibe a síntese de proteínas, entre elas o colágeno²¹.

Surpreendentemente, o zinco se mostrou importante também nas funções fisiológicas envolvendo a mimetização da insulina. Em 1980, COULSTON e DANDONA²² foram os primeiros a relatar alguma atividade insulin-mimética do zinco onde a administração de ZnCl₂ a ratos tratados com STZ (streptozocin) normalizaram as taxas de glicose. Porém, foram utilizadas altas doses do composto e o tratamento realizado foi longo (8 semanas).

Tabela 2 - Complexos de zinco (II) com efeito hipoglicemiante.

Modo	Complexo
N_2O_2	
O_4	

Fonte: adaptado de SAKURAI, H. et al.¹⁸.

I.3 Complexos de metais de transição com açúcares

Sabe-se que os açúcares são uma das classes de compostos mais abundantes presentes livremente na natureza ou como constituintes de outras biomoléculas como ácidos nucleicos, glicoproteínas, glicolipídeos entre outros. Se concentram em plantas e animais como moléculas pequenas de baixo peso molecular (mono e dissacarídeos) ou como polímeros (polissacarídeos). Nas plantas os carboidratos se formam através do processo de fotossíntese a partir da reação de dióxido de carbono e água. Os animais adquirem os carboidratos pela ingestão de plantas e os transformam em uma imensa variedade de compostos orgânicos por diferentes rotas sintéticas²³.

Os açúcares são reconhecidos por participar de importantes processos nos sistemas biológicos, não apenas no metabolismo de carboidratos mas também na redução e complexação de vários íons metálicos. Embora estas interações tenham sido estudadas desde o século passado, a compreensão da química de coordenação destes tipos de ligantes ainda deixa muito a desejar. Isto se deve ao fato de que a caracterização quantitativa do equilíbrio de coordenação do íon metálico com poliálcoois e outros ligantes do tipo açúcar contendo apenas grupos alcoólicos e aldeído (ou cetona) como doadores de oxigênio, é dificultado devido à baixa estabilidade dos complexos formados em pH's ácidos ou próximos da neutralidade. Isso explica porque os estudos da química de coordenação destes tipos de ligantes com metais de transição ainda é pouco explorado^{24, 25, 26}.

O isolamento da *Vanadobin*²⁷, um composto verde-claro, de baixo peso molecular, contendo um açúcar redutor ligado ao vanádio causou grande interesse na investigação a respeito das interações químicas e bioquímicas dos complexos formados entre açúcares e vanádio.

A busca de novos fármacos contra a diabetes que ao contrário da insulina, sejam oralmente ativos e com baixa toxicidade utilizando complexos de vanádio particularmente na forma inorgânica de vanadato (VO_4^{3-}) e vanadila (VO^{2+}) com diferentes ligantes é uma área de grande interesse. Com este objetivo desejou-se iniciar o estudo da complexação de diferentes açúcares com metais de transição e particularmente com o íon vanadila.

I.4 Estudo em solução

I.4.1 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica é uma importante ferramenta para a melhor compreensão do comportamento de moléculas em solução, já que através desta técnica é possível determinar as constantes de estabilidade dos complexos formados. O método baseia-se na adição de ácido ou base à uma solução contendo quantidades equimolares de ligante e metal acompanhando a variação do $p[H]$.

O aparecimento de uma ou mais regiões tampões numa curva de titulação, mostra que reações ácido-base ou de complexação acontecem. Os dados experimentais são utilizados para se calcular as constantes de equilíbrio envolvidas.

Diversos trabalhos com estudos de equilíbrio de açúcares e diferentes metais bivalentes e trivalentes foram publicados na última década, o que demonstra o grande interesse nestes tipos de complexos e principalmente a sua utilização em processos biológicos^{27, 28, 29, 30, 31 32, 33}.

I.4.2 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Esta técnica é muito utilizada para o estudo de espécies que possuem elétrons desemparelhados, baseia-se na aplicação de um campo magnético sobre uma espécie que apresenta elétrons desemparelhados, gerando desta forma um espectro³⁴.

Uma das informações que podem ser obtidas a partir de um espectro de RPE é o valor de “g”, que caracteriza o ambiente no qual o centro paramagnético está inserido. Um mesmo centro paramagnético pode apresentar diferentes valores de g dependendo dos ligantes envolvidos com este centro e da simetria molecular do composto. Este valor é uma função da relação entre a frequência ν e o campo magnético H nas condições de ressonância e pode ser calculado pela equação abaixo, a partir dos dados obtidos no espectro de RPE:

$$g = (H \cdot \nu) / (\beta \cdot H)$$

onde: $H = 6,626176 \times 10^{-34} \text{ J.s}$

$$\beta = 9,2740154 \times 10^{-28} \text{ J.G}^{-1}$$

ν = dado em gigahertz (GHz)

H = dado em Gauss

Muitos autores utilizam o RPE além das técnicas mais conhecidas como Infravermelho, Ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons para analisar os complexos formados entre ligantes do tipo açúcar e metais que possuam elétrons desemparelhados, como o vanádio(IV) e Cu(II)^{35, 36, 37}.

II - OBJETIVOS

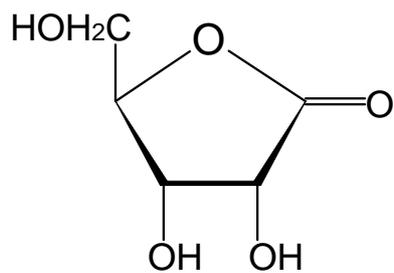
II.1 Objetivos gerais

- Contribuir para a melhor compreensão da química de coordenação entre os carboidratos e íons metálicos.
- Obter e caracterizar em solução aquosa um complexo de vanádio(IV) com um ligante que apresente baixa toxicidade e possua ação hipoglicemiante para ser futuramente utilizado como substituinte da insulina no tratamento da Diabetes Mellitus.

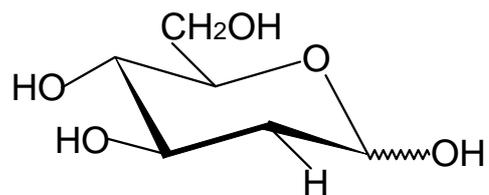
II.2 Objetivos específicos

Este trabalho tem como objetivos principais:

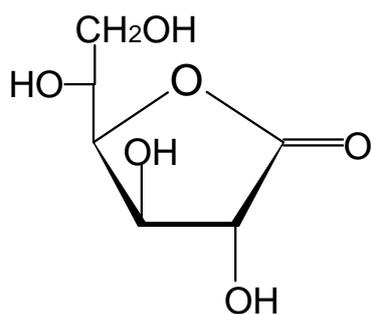
- Estudar os equilíbrios ácido-básicos e de complexação entre os íons vanadila (VO^{+2}) e Zn^{2+} com os seguintes açúcares: ácido D-Glicônico (sal potássico), D-Ribono-1,4-lactona (γ -lactona), D-Galactono-1,4-lactona (γ -lactona) e 2-deoxi-D-Glicopiranosose em meio aquoso.
- Utilizar técnicas de análise espectroscópicas como RPE para analisar os complexos dos açúcares formados em solução.
- Realizar testes biológicos em ratos diabéticos (modelo de Diabetes do tipo I) da atividade hipoglicêmica dos complexos de açúcares-VO que sejam estáveis no p[H] fisiológico.



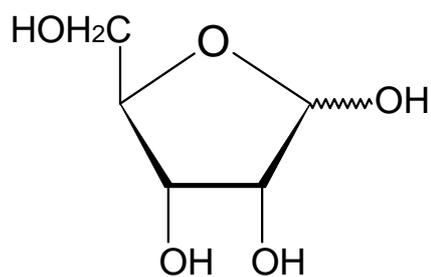
D-Ribono-1,4-lactona



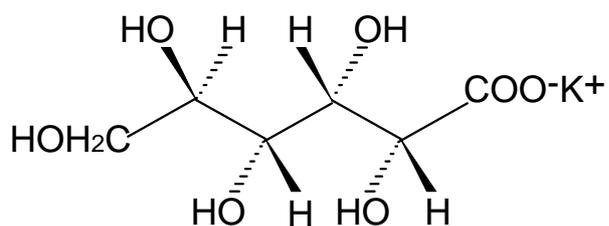
2-deoxi-D-Glicopiranosose



D-Galactono-1,4-lactona



D - Ribose



Ác. D-Glicônico (sal potássico)

Figura 2 - Monossacarídeos estudados neste trabalho.

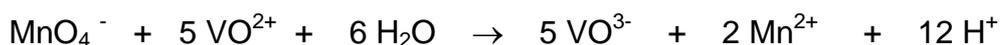
III - PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Materiais

Todos os açúcares (ác. D-Glicônico (sal potássico), D-ribose, D-ribono-1,4-lactona, D-galactono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-glicopirranose) e os sais metálicos de grau analítico p. a. (VOSO_4 e ZnCl_2) foram obtidos a partir de fonte comercial (Sigma e Aldrich respectivamente) e utilizados sem prévia purificação.

A solução estoque de VO^{+2} de concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, foi preparada pesando-se quantidades equimolares de VOSO_4 e BaCl_2 e diluindo-se em água previamente bidestilada e fervida (para evitar a presença de CO_2 dissolvido) à 80°C até completa precipitação de BaSO_4 . Ao filtrado adicionou-se solução de ácido clorídrico aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ M para evitar a hidrólise deste cátion em solução. A concentração exata de ácido clorídrico presente na solução foi calculada através do plote de $(V_o + V_{\text{KOH}}) 10^{-\text{pH}}$ versus V_{KOH} onde V_o é o volume inicial da solução do íon metálico e V_{KOH} é o volume de base padrão, segundo o método de Gran³⁸.

A concentração exata do metal em solução foi determinada através da titulação da mesma com solução padrão de KMnO_4 (permanganato de potássio) através do método que utiliza a reação de óxido-redução³⁹:



A solução estoque de Zn^{2+} foi preparada com água bidestilada e fervida com concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M e padronizada através da titulação direta da

solução metálica com solução padrão de EDTA (ácido etilenodiaminatretetracético) $1,0 \times 10^{-2}$ M, na presença do indicador erio cromo T utilizando tampão pH 10⁴⁰.

A solução de KOH padrão isenta de CO₂ utilizada nas titulações potenciométricas, foi preparada por diluição de ampolas “Diluit - it” (Baker) de hidróxido de potássio concentrado e livre de CO₂ em concentração de 0,1 M. Esta solução foi padronizada com biftalato de potássio utilizando fenolftaleína como indicador e protegida através de um “trapp” contendo solução de KOH concentrada para evitar a entrada de CO₂ atmosférico.

Para os experimentos de medidas de RPE, as soluções do complexo foram feitas em água bidestilada e na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M na razão molar entre metal (M) e ligante (L) de 1:1 (M:L).

Nos testes biológicos foram utilizados ratos Wistar machos adultos entre 45-50 dias de idade e 160-190 g de peso corporal provenientes do biotério central da UFSC. Os animais foram mantidos em uma sala com sistema de exaustão e com controle de claro-escuro (das 18 h às 6 h - escuro e das 6 h às 18 h - luz natural), em temperatura de cerca de 25°C e em gaiolas plásticas. Os animais foram alimentados com ração comercial e água “*ad libitum*”. A solução do complexo de HGli-VO foi feita momentos antes do início dos experimentos e foi mantida em pH fisiológico (7,4) para que pudesse ser administrada nos animais.

III.2 MÉTODOS

III.2.1 Estudo potenciométrico

As titulações potenciométricas foram realizadas em um sistema de célula de vidro termostaticada, selada e sob atmosfera inerte (Ar) de acordo com a figura 3:

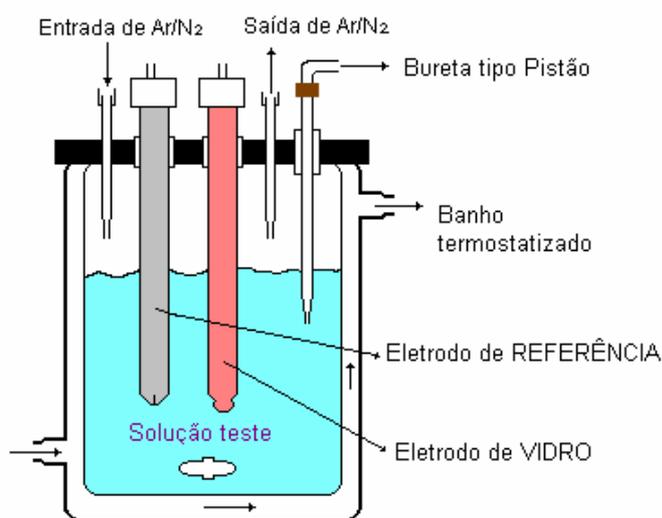


Figura 3 - Sistema utilizado na titulação potenciométrica.

Para o sistema de medida de $p[H]$, utilizou-se um pHmetro da marca CORNING modelo 350 equipado com um eletrodo de referência do tipo Ag/AgCl e um eletrodo de vidro, ambos da marca Ingold. A precisão do pHmetro é de 3 casas decimais e a inclinação da curva de titulação foi previamente ajustada⁴¹. O titulante foi adicionado em alíquotas de 0,1 a 0,5 mL

utilizando uma bureta automática tipo pistão, de marca SCHOTT GERATE. Periodicamente, o sistema era calibrado com soluções tampões de p[H] 4, 7 e 9, e também através da titulação de uma solução diluída de HCl ($1,0 \times 10^{-2}$ M) para verificar a inclinação da curva de titulação.

Em todas as titulações, a força iônica foi mantida constante em 0,1 M com a adição de eletrólito suporte KCl e antes do início de cada experimento o p[H] de uma alíquota de solução de HCl (aproximadamente $1,0 \times 10^{-2}$ M) foi medido e comparado com o valor de p[H] previamente calculado.

Os cálculos das constantes de protonação, e das constantes de complexação foram determinadas com a ajuda do programa computacional BEST7⁴¹ e as curvas de distribuição de espécies foram obtidas com o auxílio dos programas SPE e SPEPLOT⁴¹.

III.2.2 Estudo de RPE

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrofotômetro de RPE da marca BRUKER modelo ESP 300E da Universidad de Granada (Espanha). Todos os experimentos foram feitos em temperatura ambiente e em solução aquosa. O campo magnético foi mantido em 3.500,00 Gauss e com frequência de 9,79000 GHz. Para cada medida o aparelho realizava uma varredura de 5 scans e o espectro final era a média de todos os espectros obtidos.

Para que os experimentos pudessem ser feitos em solução e à temperatura ambiente (não congelado), as soluções eram colocadas em capilares de vidro (por capilaridade) e a extremidade inferior vedada com

silicone para auto-vácuo, posteriormente este capilar era introduzido no tubo de vidro de RPE.

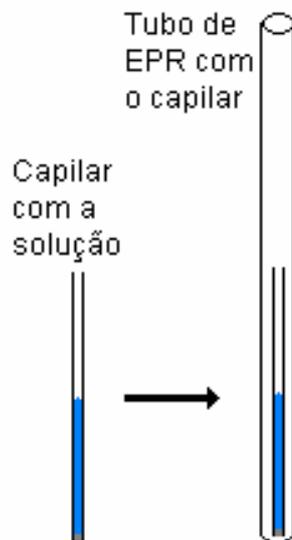


Figura 4 - Representação do sistema utilizado para as medidas de EPR.

III.2.3 Ensaio biológicos

III.2.3.1 Animais diabéticos induzidos com Aloxana

Os animais foram pesados. A solução de monohidrato de aloxana (SIGMA) em 2% de soro fisiológico foi preparada imediatamente antes do uso. Após 16 h de jejum induziu-se a diabetes com aloxana (70 mg/Kg de peso corporal) pela via peniana em animais sob anestesia etérea. Três dias depois foram coletadas as amostras de sangue e os níveis de glicose foram determinados para confirmar o desenvolvimento da diabetes. Considerou-se

diabéticos apenas os ratos que apresentavam glicose entre 480-570 mg/dL de glicose⁴².

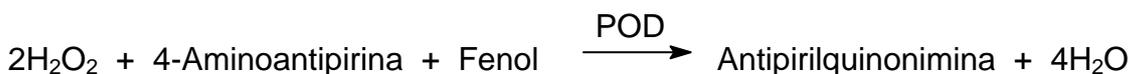
III.2.3.2 Tratamento com o complexo HGli-VO

O tratamento em ratos diabéticos foi realizado via intraperitoneal e oral após administração da dose de 100 mg/Kg de peso corporal do complexo. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após o tratamento.

Antes da coleta de sangue todos os animais foram mantidos em jejum por 16 horas. O sangue foi coletado por capilaridade pela glândula lacrimal em tubos de *Eppendorf*. Após centrifugadas, as alíquotas de 10 µL de plasma (em duplicatas) foram utilizadas para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GOD) da LABTEST. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase (POD) através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



As amostras foram incubadas por 15 minutos à 37°C. As absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro da marca Pharmacia LKB-Ultrospec III em 505 nm. Todas as dosagens glicêmicas foram feitas dentro de uma hora após a coleta do sangue e os resultados foram expressos em mg/dL de glicose.

Os dados foram expressos como a média \pm S.E.M. (standard error mean) e comparados estatisticamente através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT (versão 1.121). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor do que 0,05 ($p \leq 0,05$)⁴³.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

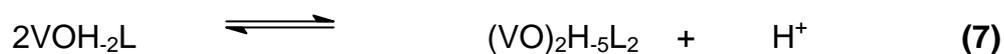
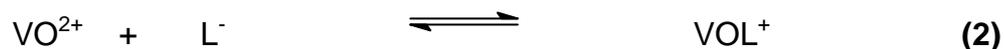
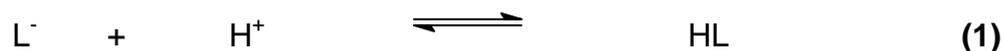
IV.1 Potenciometria

IV.1.1 Estudo dos equilíbrios dos açúcares com o oxocátion VO^{2+}

As curvas de titulação potenciométrica dos açúcares em presença do oxovanádio (IV) aparecem nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

A complexação do ác. D-Glicônico com o íon vanadila pode ser confirmada através do deslocamento da curva de titulação do ligante coordenado em relação ao ligante sozinho, mostrado na Figura 4. Observa-se através destas curvas de equilíbrio potenciométrico que a complexação deste ligante com o íon vanadila é iniciada em p[H] ácido, perto de 3, ocorrendo a neutralização de quase 3 mols de prótons por mols de açúcar até atingir a inflexão. O tampão em valores de p[H] acima de 8 mostra o consumo de mais 1 mol de KOH por mol de ligante. Este foi o único açúcar que permaneceu solúvel durante toda a faixa de p[H] estudada (2 a 11).

Os equilíbrios envolvidos no sistema HGli-VO são definidos pelas equações 1-7 onde HL e L^- são as espécies protonada e desprotonada do ác. D-Glicônico, respectivamente; VO^{2+} é o íon oxovanádio(IV) aquoso e VOL^+ , $VOH_{-1}L$, $VOH_{-2}L^-$, $VOH_{-3}L^{2-}$ e $VOH_{-4}L^{3-}$ são as espécies mononucleares dos complexos formados com nenhuma, uma, duas, três e quatro hidroxilas do ác. D-Glicônico desprotonadas pelo íon metálico na complexação.



Os valores das constantes dos equilíbrios definidos pelas Equações 1-7 aparecem na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de log K para os equilíbrios ácido-básicos e de complexação do HGLi com o íon vanadila, a 25°C e $\mu = 0,100$ M.

Espécies	Log K
$[HL] / [H^+] [L^-]$	3,60 (3,46) ^a
$[VOL^+] / [VO^{2+}] [L^-]$	3,90
$[VOH_{.1}L] [H^+] / [VOL^+]$	- 3,46
$[VOH_{.2}L^-] [H^+] / [VOH_{.1}L]$	- 4,00
$[VOH_{.3}L^{2-}] [H^+] / [VOH_{.2}L^-]$	- 8,84
$[VOH_{.4}L^{3-}] [H^+] / [VOH_{.3}L^{2-}]$	- 11,18
$[(VO)_2H_{.5}L_2] [H^+] / [VOH_{.2}L^-]^2$	- 6,60

^a MARTELL, A. E. and MOTEIKAITIS, R. J. *The determination and use of stability constants*. 2nd ed. New York: VCH publishers, 1992.

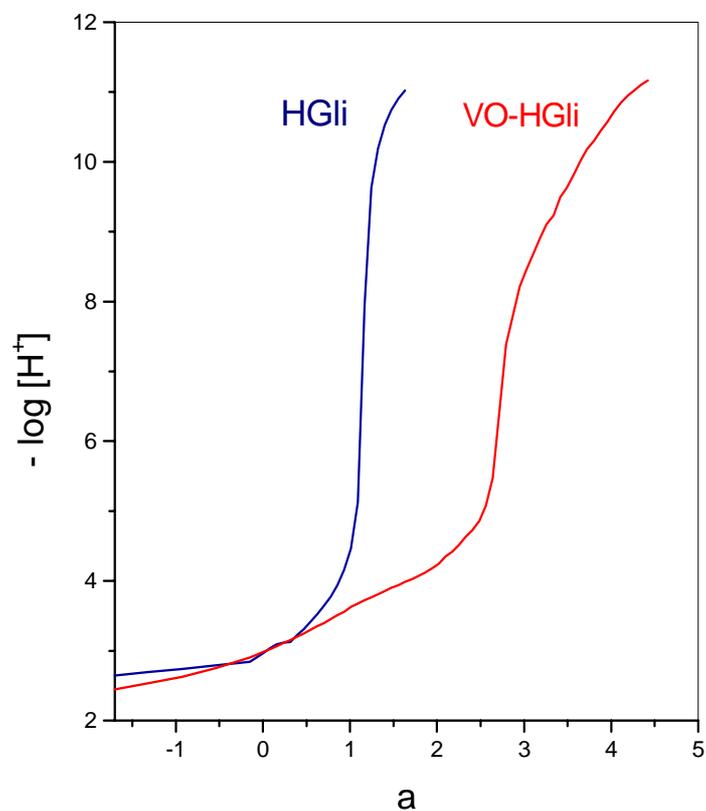


Figura 5 - Curvas de equilíbrio potenciométrico do ác. D-Glicônico na ausência e na presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde $a = \text{mol base/mol ligante}$. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

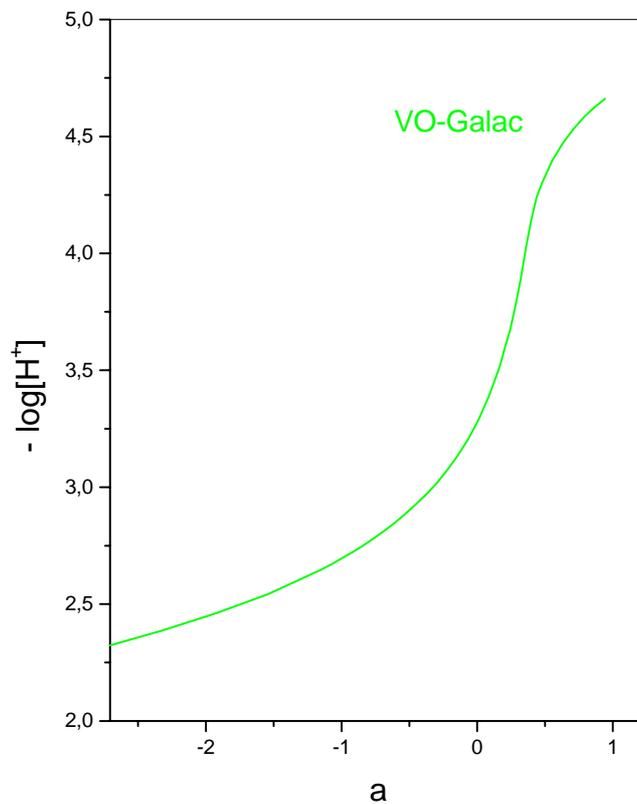


Figura 6 - Curva de equilíbrio potenciométrico do D-Galactono-1.4-lactona em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100 \text{ M}$ (KCl). Onde $a = \text{mol base/mol ligante}$. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

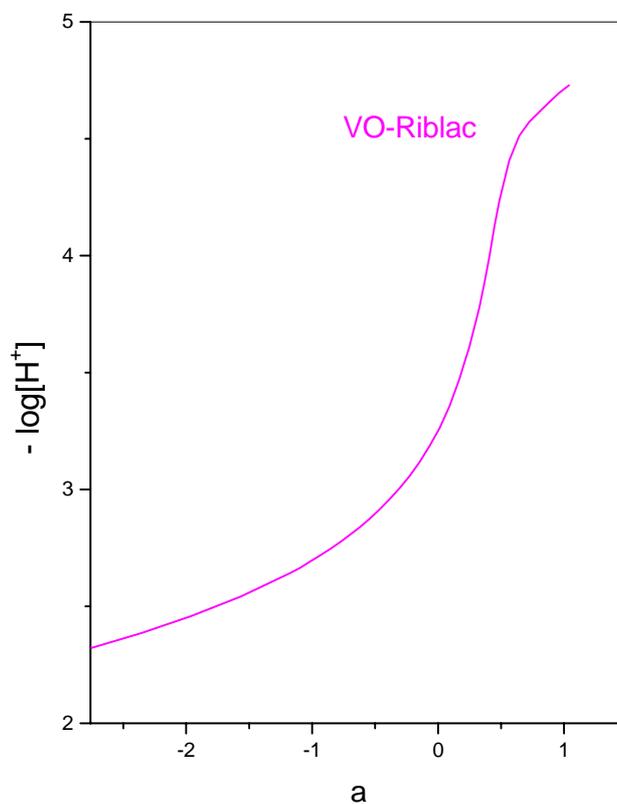


Figura 7 - Curva de equilíbrio potenciométrico do D-Ribono-1,4-lactona em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde $a = \text{mol base/mol ligante}$. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

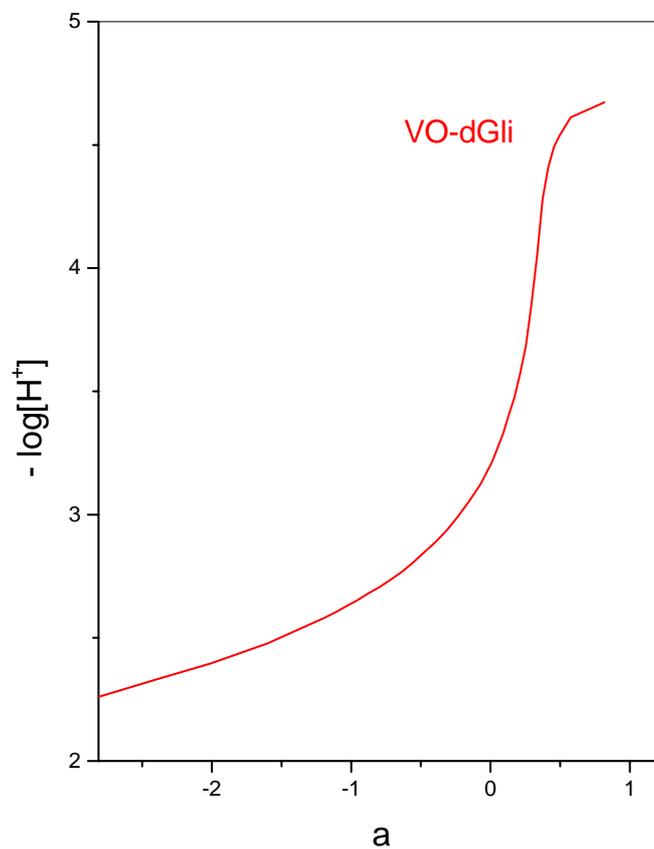


Figura 8 - Curva de equilíbrio potenciométrica do 2-deoxi-D-Glicopiranosose em presença do íon VO^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde a = mol base/mol ligante. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

As curvas de equilíbrio potenciométrico para os demais açúcares D-Galactono-1,4-lactona, D-Ribono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-Glicopiranosose foram mostradas nas Figuras 6, 7 e 8 respectivamente. Nota-se que estas curvas são muito semelhantes e são interrompidas devido à precipitação do produto insolúvel da hidrólise do metal.

As constantes dos equilíbrios definidas pelas Equações 8 e 9 estão na Tabela 4. L representa os açúcares D-Galactono-1,4-lactona, D-Ribono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-Glicopiranosose.

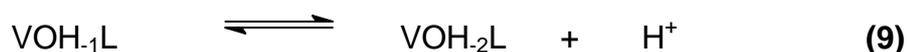


Tabela 4 - Valores de log K para os equilíbrios de complexação dos ligantes Galac, Riblac e dGli com o íon VO^{2+} a 25°C e $\mu = 0,100 \text{ M}$.

Espécies	Log K		
	Galac	Riblac	dGli
$[\text{VOH}_{.1}\text{L}][\text{H}^+] / [\text{VO}^{2+}][\text{L}]$	- 0,78	- 0,64	- 0,88
$[\text{VOH}_{.2}\text{L}][\text{H}^+] / [\text{VOH}_{.1}\text{L}]$	- 4,92	-4,93	- 5,32

Estes açúcares não coordenam suficientemente bem para evitar a hidrólise do íon metálico e sua precipitação. A ordem decrescente das constantes de complexação desses açúcares (Tabela 4) é:

Riblac>Galac>dGI

As curvas de distribuição das espécies do sistema VO-HGli são mostradas na Figura 9.

Observa-se que para este ligante, ocorre a formação de mais espécies do que para os demais açúcares, isto se deve ao fato de que este é o único derivado de açúcar de cadeia aberta, possuindo muito mais liberdade estérica para coordenar suas hidroxilas ao metal, não permitindo que o mesmo sofra hidrólise e precipitação. Em p[H] ácido, predominam as espécies VOL e VOH₁L, esta última atingindo um máximo de 42 % em p[H] = 3,8. No p[H] próximo à neutralidade ocorre a formação de quase 100% da espécie VOH₂L, que corresponde à espécie com dois grupos OH desprotonados ao coordenar-se ao íon metálico além do grupo carboxilato. Esta é a possível forma presente no p[H] fisiológico (7,4), sendo de grande interesse para este trabalho.

Já em p[H] 8,8 surge curiosamente a presença da espécie (VO)₂H₅L₂, que é atribuída à formação de um complexo dinuclear com uma ponte hidroxil unindo os dois centros metálicos (Figura 10). Embora esta espécie se forme em pequena porcentagem (7%), a sua identificação justifica a estequiometria observada na potenciometria.

A espécie VOH₃L tem um máximo de formação em p[H] 10,1 e representa mais uma desprotonação de um grupo OH do açúcar.

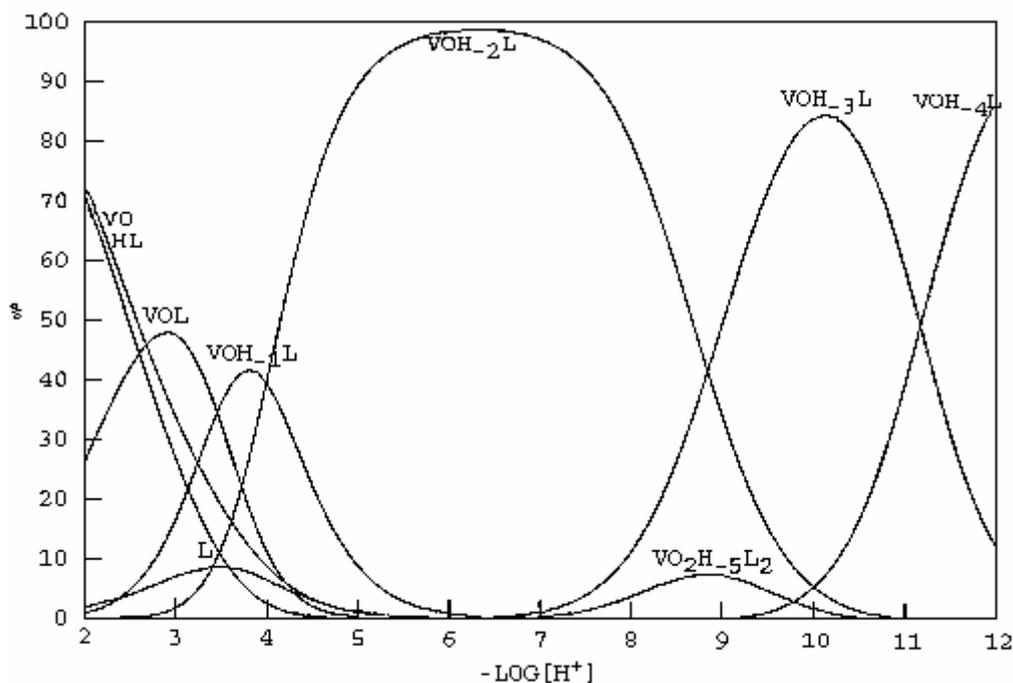
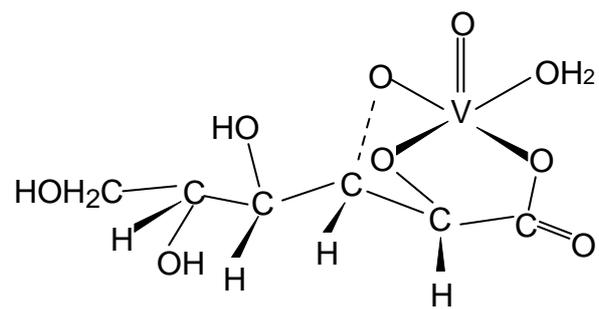
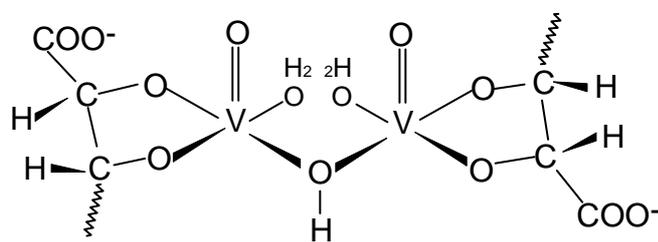


Figura 9 - Curva de distribuição de espécies formadas no sistema VO-HGli, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, HL é a espécie totalmente protonada do ligante e VOL representa o complexo normal. VOH₁L, VOH₂L, VOH₃L e VOH₄L são as formas mono-, di-, tri- e tetra-desprotonadas e VO₂H₅L₂ representa a espécie dinuclear do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.



[VOH-2L]



[(VO)₂H-5L₂]

Figura 10 - Espécies VOH-₂L e VO₂H-₅L₂, formadas entre o ligante HGli e o íon vanadila.

A identificação da espécie VOH_4L causou dúvidas quanto à sua origem, pois imaginava-se que esta espécie seria formada através da coordenação de uma hidroxila oriunda de uma molécula de água por causa de seu elevado valor de pK_a , porém, estudos com modelos moleculares mostraram a possibilidade de esta ser uma quarta hidroxila proveniente do ligante, formando assim um complexo com 4 grupos OH coordenados ao centro metálico.

As espécies formadas pelo íon vanadila e os açúcares D-Galactono-1,4-lactona, D-Ribono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-Glicopiranosose são apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13.

Devido ao fato destes açúcares serem de cadeia fechada, isto impede que um número maior do que duas hidroxilas do anel coordenem ao íon metálico. Portanto, nestes sistemas somente duas espécies foram detectadas antes de ocorrer a precipitação do produto de hidrólise do metal, VOH_1L e VOH_2L com um e dois grupos OH desprotonados, respectivamente.

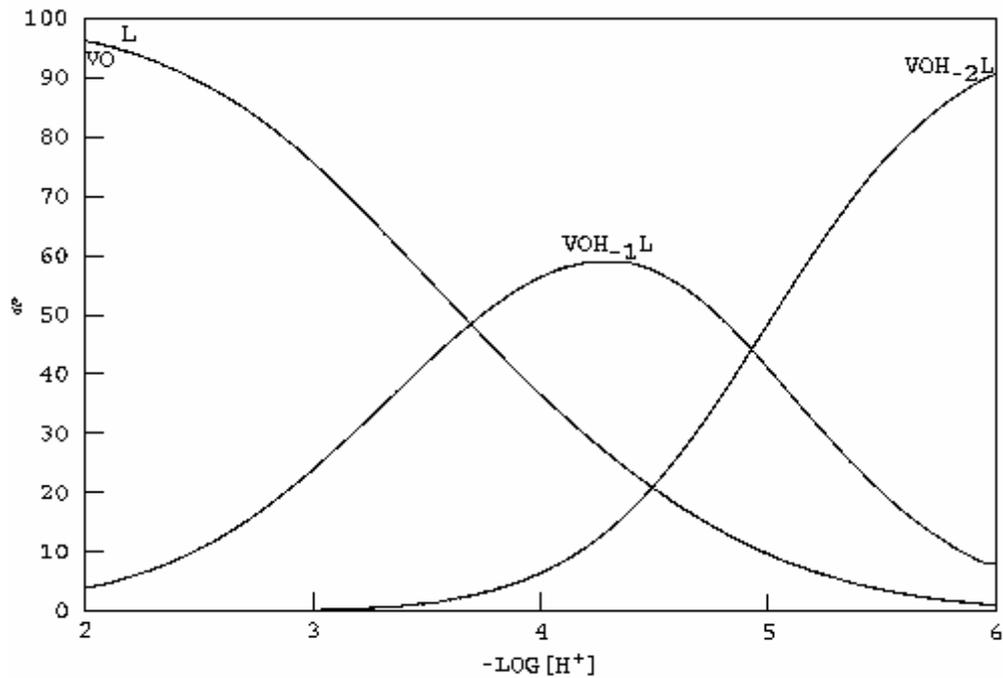


Figura 11 - Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-Galac, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, L é a espécie totalmente protonada do ligante. VOH₁L e VOH₂L, são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

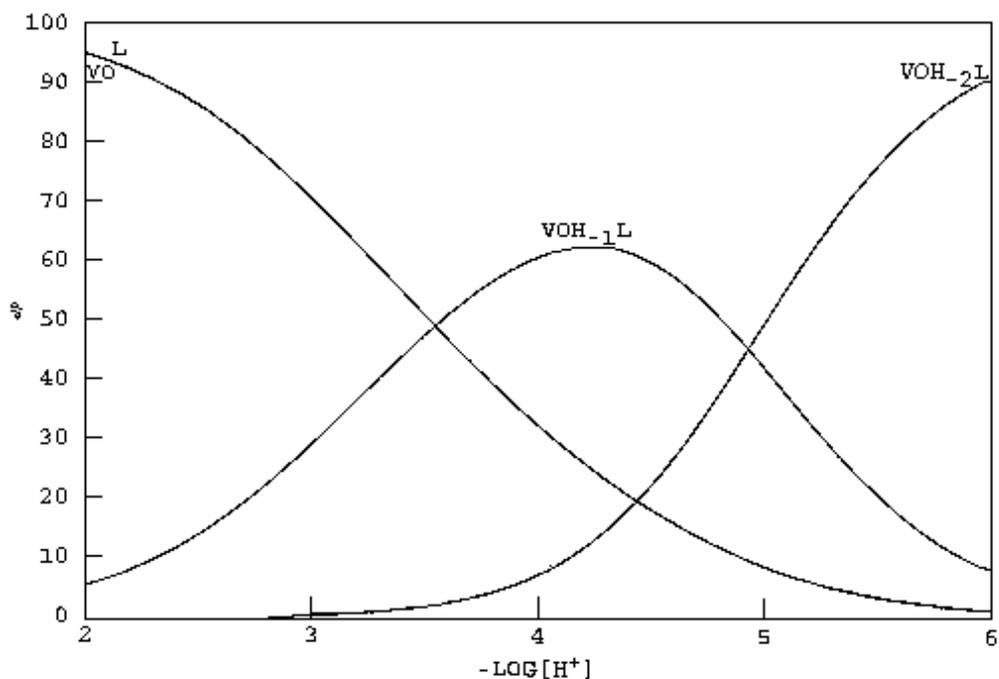


Figura 12 - Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-Riblac, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, L é a espécie totalmente protonada do ligante. VOH₁L e VOH₂L, são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-2}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

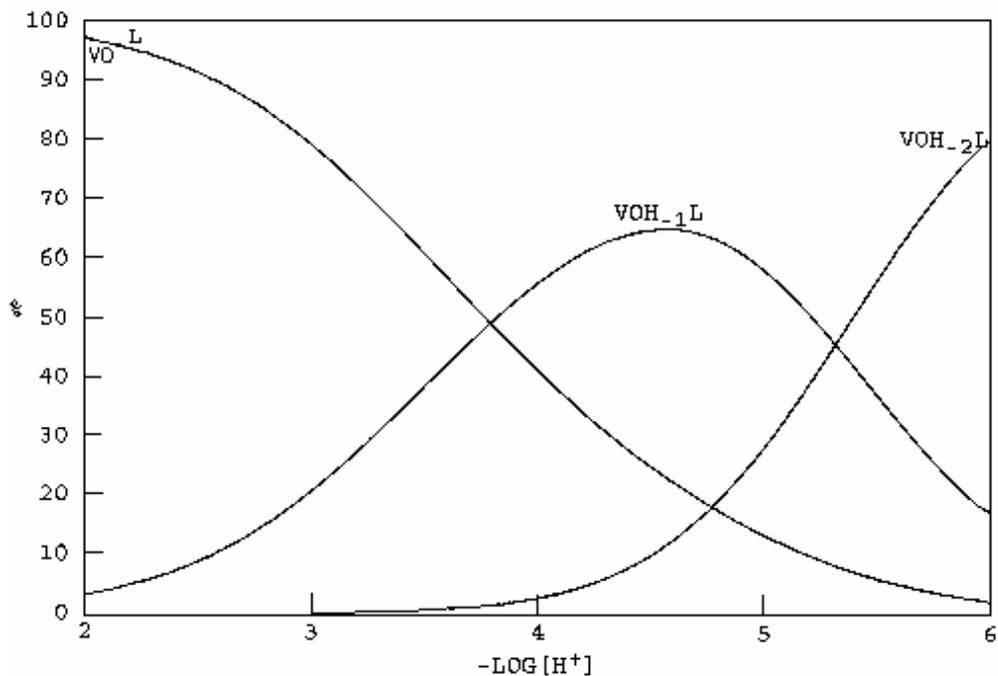
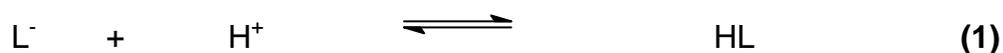


Figura 13 - Curva de distribuição das espécies formadas no sistema VO-dGli, na razão 1:1 M:L, em função do p[H] onde: VO é o íon livre aquoso, L é a espécie totalmente protonada do ligante. VOH₁L e VOH₂L, são as formas mono- e di- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de 1,0 x 10⁻² M, T = 25°C e μ = 0,100 M.

IV.1.2 Estudos dos equilíbrios dos açúcares com o íon Zn^{2+}

As curvas de titulação potenciométrica dos açúcares e o íon zinco(II) são mostradas nas Figuras 14, 15, 16 e 17. Observa-se que a complexação dos açúcares acontece em valores de $p[H]$ mais altos do que para o íon vanadila. Na Figura 14 nota-se que ocorre o consumo de 2,5 moles de KOH por mol de ligante quando inicia-se a precipitação da espécie $Zn(OH)_2$ e o experimento foi interrompido.

As constantes dos equilíbrios de protonação e complexação para o ác. D-Glicônico e o Zn (II) definidos pelas equações **1** e **10** a **13** são mostradas na Tabela 5. Nesses equilíbrios L representa o ác. D-Glicônico, Zn^{2+} é o íon zinco aquoso e ZnL^+ é a espécie complexada do íon Zn (II) com o grupo carboxilato. As espécies $ZnH_{-1}L$, $ZnH_{-2}L^-$ e $ZnH_{-3}L^{2-}$ são as espécies que envolvem a desprotonação de uma e duas hidroxilas dos açúcares e a desprotonação de uma molécula de água coordenada, respectivamente. Entretanto este açúcar não coordenada suficientemente forte para evitar a hidrólise do íon zinco(II) e a precipitação da espécie $Zn(OH)_2$.



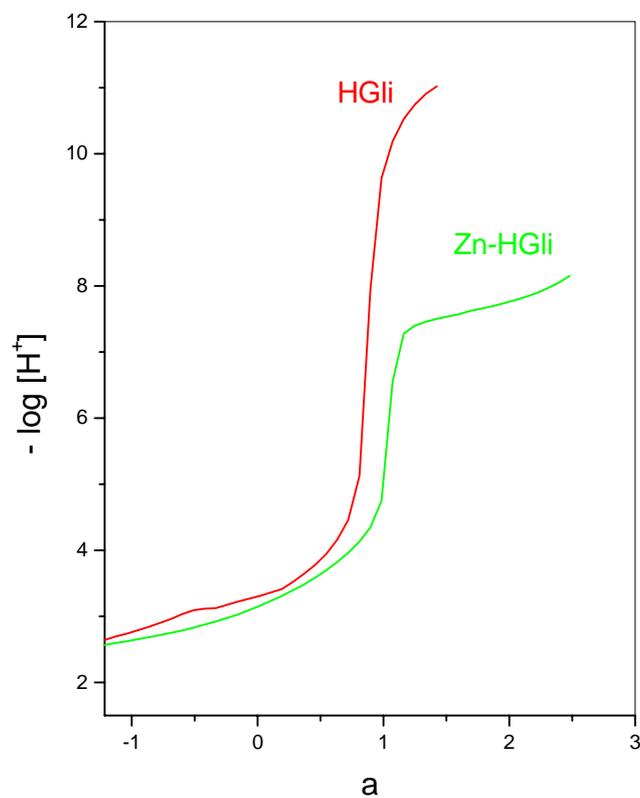


Figura 14 - Curvas de equilíbrio potenciométrico do açúcar ác. D-Glicônico na presença e na ausência do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde $a = \text{mol base/mol ligante}$. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

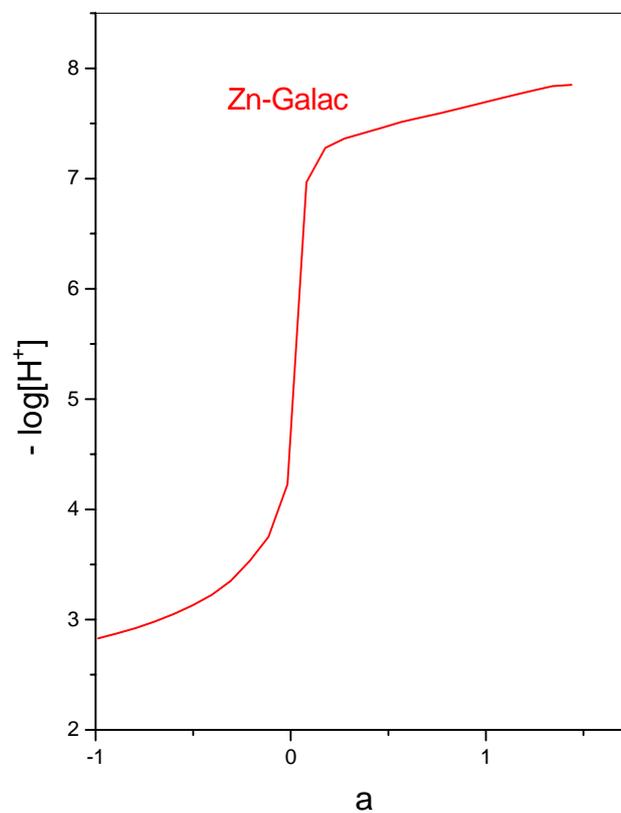


Figura 15 - Curva de equilíbrio potenciométrica do açúcar D-Galactono-1,4-lactona em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde a = mol base/mol ligante. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

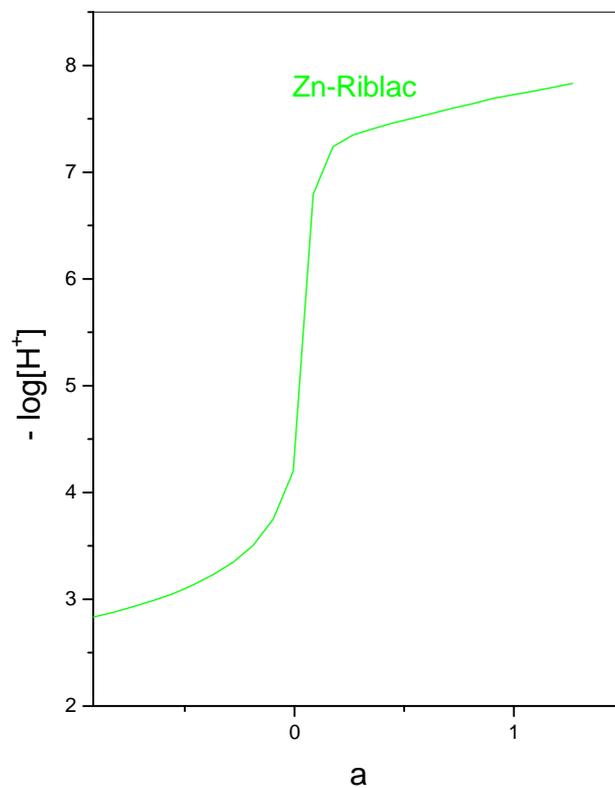


Figura 16 - Curva de equilíbrio potenciométrica do açúcar Riblac em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a $25^{\circ}C$ e $\mu = 0,100 M$ (KCl). Onde $a = \text{mol base/mol ligante}$. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

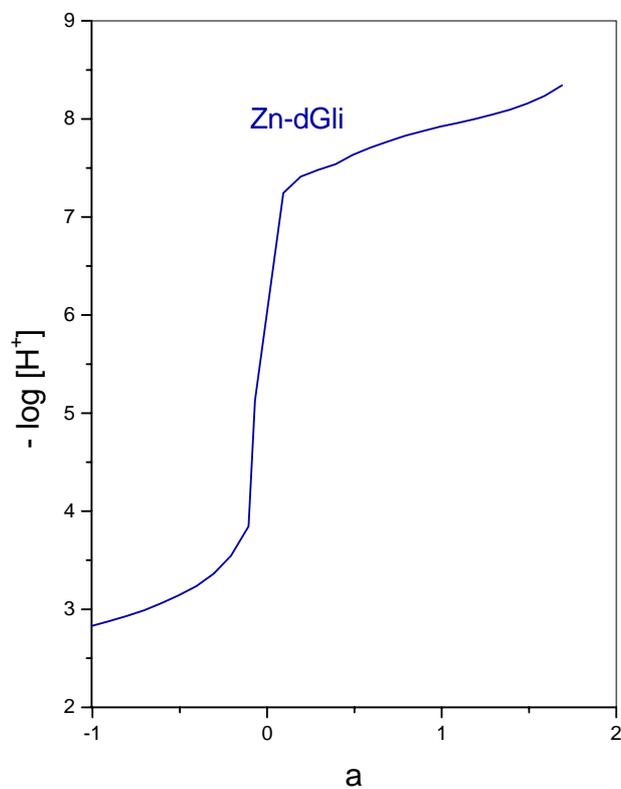


Figura 17 - Curva de equilíbrio potenciométrico do açúcar dGli em presença do íon Zn^{2+} , na proporção 1:1 (M:L), a 25°C e $\mu = 0,100$ M (KCl). Onde a = mol base/mol ligante. Os valores negativos na abcissa representam a neutralização do excesso de ácido proveniente da solução metálica.

Tabela 5 - Valores de log K para os equilíbrios de complexação do ácido D-Glicônico (HGI)_i com o íon Zn²⁺ a 25°C e μ = 0,100 M.

Espécies	HGI _i
$[HL] / [H^+] [L^-]$	3,60 (3,46) ^a
$[ZnL^+] / [Zn^{2+}] [L^-]$	1,70 (1,70) ^a
$[ZnH_{-1}L] [H^+] / [ZnL^+]$	- 6,97
$[ZnH_{-2}L] [H^+] / [ZnH_{-1}L]$	- 7,33
$[ZnH_{-3}L^{2-}] [H^+] / [ZnH_{-2}L]$	- 7,51

^a MARTELL, A. E. and MOTEIKAITIS, R. J. *The determination and use of stability constants*. 2nd ed. New York: VCH publishers, 1992.

Com exceção ao HGI_i, os demais açúcares apresentaram um comportamento semelhante entre si, como mostrado nas Figuras 14, 15 e 16. Observa-se que nas curvas de titulação potenciométrica destes ligantes há o consumo de 2 moles de base, o que indica a neutralização de 2 prótons.

Os equilíbrios de complexação da D-galactono-1,4-lactona, D-Ribono-1,4-lactona e 2-deoxi-D-Glicopiranosose com o íon Zn (II) são definidas pelas equações **14** e **15** e os valores de suas constantes são mostradas na Tabela 6.

A coordenação desses açúcares com o íon zinco (II) não é eficiente o bastante para evitar a hidrólise do metal, sendo a dGli o açúcar que se coordena mais fracamente.

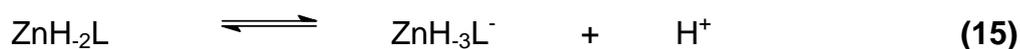


Tabela 6 - Valores de log K para os equilíbrios de complexação dos açúcares D-Galactono-1,4-lactona (Galac), D-Ribono-1,4-lactona (Riblac) e 2-deoxi-D-Glicopiranosose (dGli) com o íon Zn^{2+} a 25°C e $\mu = 0,100$ M.

Espécies	Log K		
	Galac	Riblac	dGli
$[\text{ZnH}_2\text{L}] [\text{H}^+]^2 / [\text{Zn}^{2+}][\text{L}]$	- 7,59	- 7,57	- 8,26
$[\text{ZnH}_3\text{L}^-] [\text{H}^+] / [\text{ZnH}_2\text{L}]$	- 8,40	- 9,06	- 14,53

As curvas de distribuição das espécies formadas pelo íon zinco (II) com os açúcares estão representadas nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

O ác. D-Glicônico forma a espécie ZnL que apresenta o grupo carboxilato do açúcar coordenado ao íon metálico, e mais três espécies que são formadas em valores de p[H] acima de 6, indicando a coordenação de até 3 hidroxilas do açúcar.

A porcentagem das espécies formadas é baixa em valores de p[H] ácido para este sistema, sendo de 10% para a espécie ZnL e 12% para a espécie ZnH_1L em p[H] 7,4. A espécie ZnH_2L tem um máximo em p[H] 7,8 onde atinge um máximo de formação em 21%, e a espécie ZnH_3L está 95% formada em p[H] 9,0.

No p[H] fisiológico (7,4) existem várias espécies: a espécie ZnH_1L (11,7% formada), a espécie ZnH_2L (17% formada) e a espécie ZnH_3L (16% formada).

A existência de várias espécies diferentes e em pequenas quantidades tornou difícil o estudo em solução neste determinado p[H], desta forma, não se realizou os testes biológicos quanto a ação hipoglicemiante deste complexo.

Os demais açúcares apresentaram a curva de distribuição de espécies muito semelhante entre si, como ocorreu com o íon vanadila. Formam-se duas espécies, a ZnH_2L atribuída à desprotonação de duas hidroxilas oriundas do açúcar e ZnH_3L que seria correspondente à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao metal.

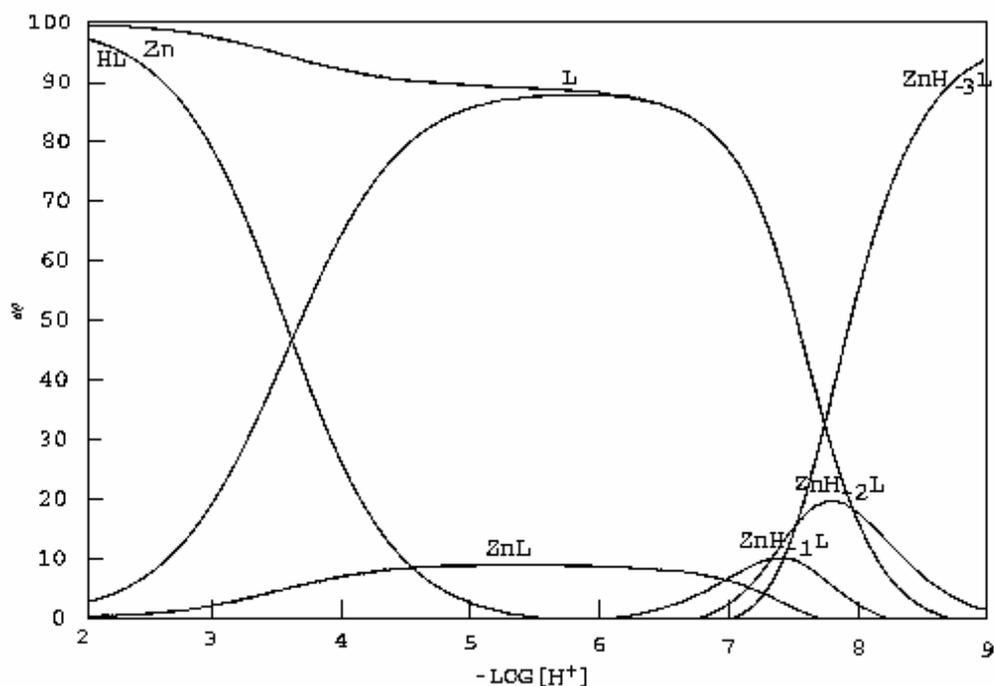


Figura 18 - Curva de distribuição de espécies formadas no sistema Zn-HGli, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso, HL é a espécie totalmente protonada do ligante e ZnL representa o complexo normal. ZnH₋₁L, ZnH₋₂L e ZnH₋₃L são as formas mono-, di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

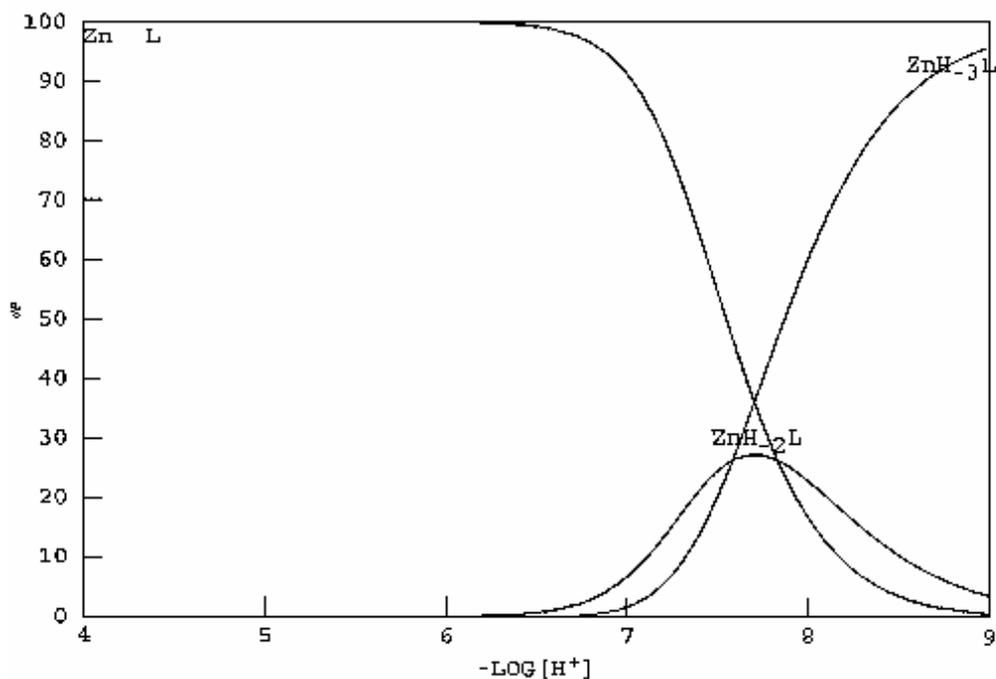


Figura 19 - Curva de distribuição de espécies formadas no sistema Zn-Galac, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. ZnH₂L e ZnH₃L são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

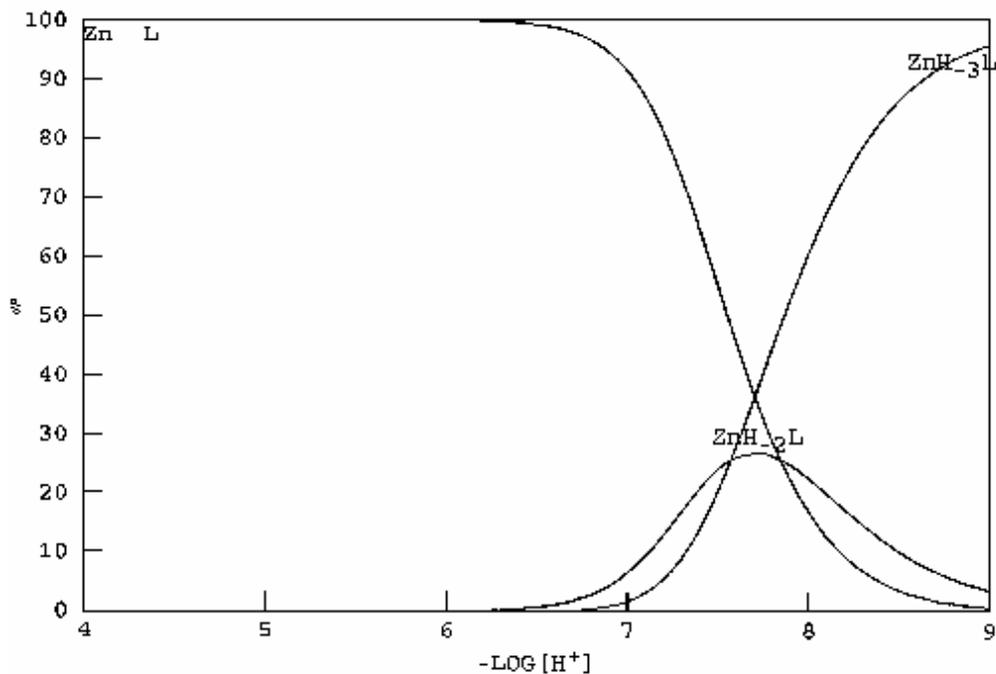


Figura 20 - Curva de distribuição de espécies formadas no sistema Zn-Riblac, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. ZnH₂L e ZnH₃L são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

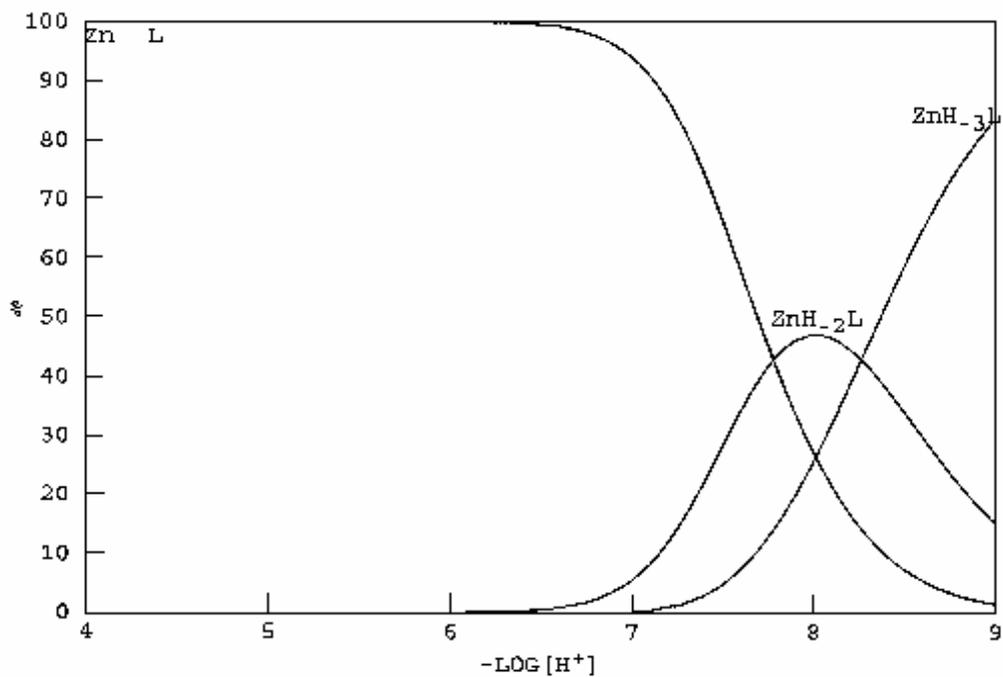


Figura 21 - Curva de distribuição de espécies formadas no sistema Zn-dGli, na razão 1:1 (M:L), em função do p[H] onde: Zn é o íon livre aquoso e L é a espécie totalmente protonada do ligante. ZnH₂L e ZnH₃L são as formas di- e tri- desprotonadas do complexo. A concentração do ligante é de $1,0 \times 10^{-3}$ M, T = 25°C e $\mu = 0,100$ M.

Nos sistemas Zn-Galac e Zn-Riblac, a espécie ZnH_2L está formada em aproximadamente 27% no p[H] 7,7. No sistema Zn-dGli essa espécie está formada em 47% no p[H] 8,0 e a espécie ZnH_3L está 83% formada em p[H] 9,0.

Dentre estes três ligantes de cadeia fechada, o que mostrou um efeito quelante mais forte tanto com o íon vanadila como para o zinco foi a D-ribono-1,4-lactona, pois possui dois grupos OH em posições *axiais* entre si. E o ligante que mostrou efeito mais fraco foi a 2-deoxi-D-Glicopiranosose, pois não possui grupos OH na posição *axial*.

A formação da espécie ZnH_1L não foi detectada nas titulações entre os açúcares cíclicos e o íon zinco (II), isto se deve ao fato de que a desprotonação do primeiro grupo hidroxila do açúcar ocorra simultaneamente ao segundo grupo, tornando impossível sua identificação.

IV.2 Estudo de RPE

Analisando qualitativamente os espectros de RPE para o complexo VO-HGli é possível confirmar a presença das espécies complexadas e do íon $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ aquoso em p[H] ácido. O espectro apresenta 8 linhas confirmando as espécies complexadas como mononucleares²⁴.

O número de linhas pode ser previsto através da relação: $2nI + 1$;

onde: n = número de núcleos quimicamente iguais;

$I = 7/2$ = número quântico de spin nuclear do vanádio (^{51}V).

Como $n = 1$, pois considera-se apenas um núcleo de vanádio, temos:

$$2(7/2) + 1 = 8 \text{ linhas}$$

O desdobramento das linhas mostradas no espectro é devido à existência de 30% da espécie aquo juntamente com as espécies complexadas em solução.

Em p[H] fortemente básico o espectro apresenta comportamento semelhante ao isotrópico, que é típico de complexos de VO-hexoses mononucleares de acordo com o encontrado na literatura³⁷.

Isso confirma que em valores de p[H] elevados existem somente espécies mononucleares. Em nosso estudo, detectamos 8% de uma espécie dinuclear com um máximo de formação em p[H] 8,80, concordando com estudos de complexos de oxovanádio que detectaram essa espécie em p[H] ao redor de 8,0 e 9,0^{37, 45}.

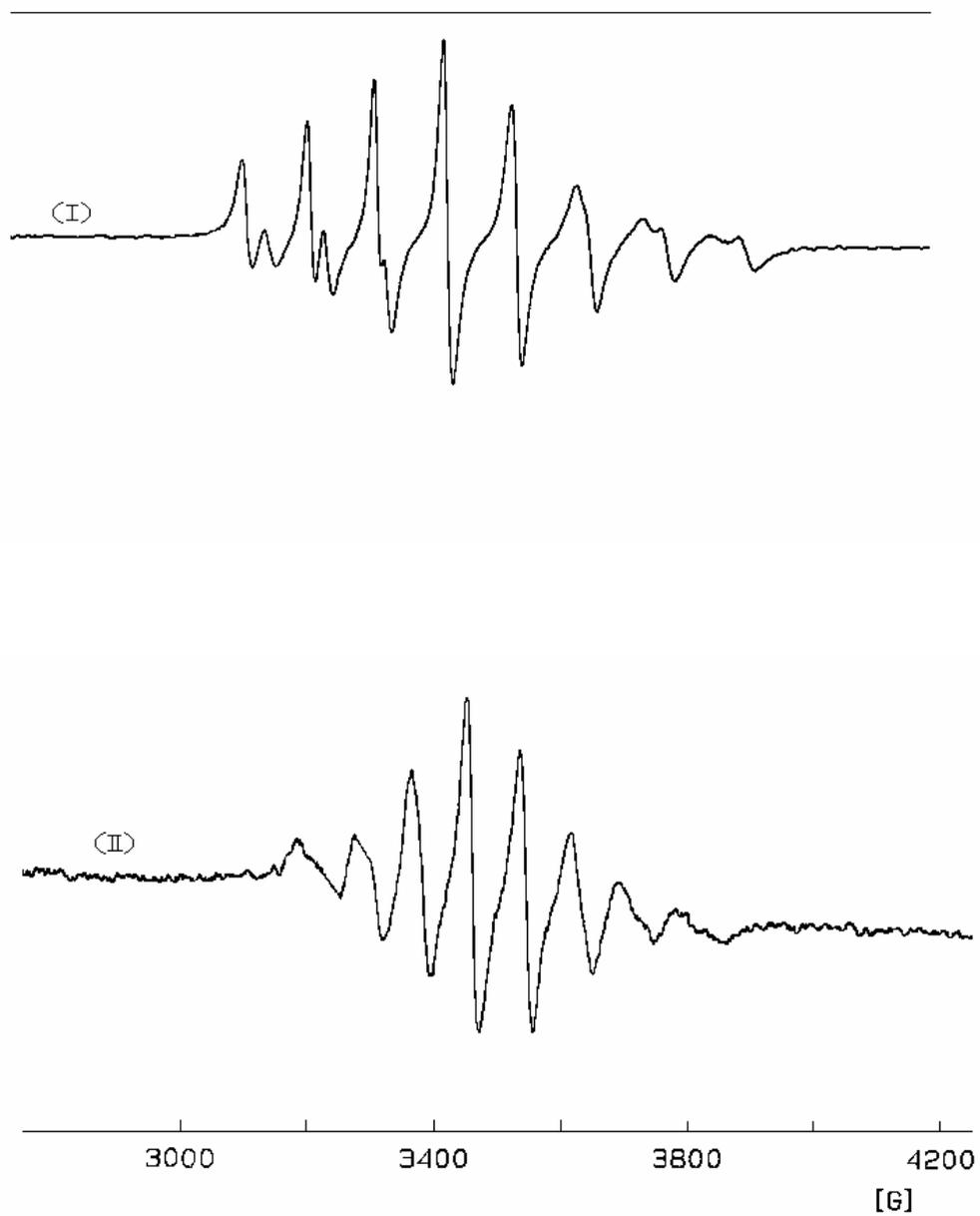


Figura 22 - Espectro de RPE do complexo VO-HGli, onde (I) p[H] 2,8, (II) p[H] 13,0, na razão 1:1 (M:L) em temperatura ambiente e concentração $1,0 \times 10^{-2}M$.

IV.3 Testes biológicos

Os valores da taxa de glicose no sangue de todos os grupos de animais estudados são mostrados na Tabela 7. O grupo I (controle) representa os animais normais, o grupo II (diabéticos) representa os animais diabéticos induzidos por aloxana, o grupo III (via i. p.) representa os animais tratados com o complexo pela via intraperitoneal e o grupo IV (via oral) representa os animais tratados com o complexo pela via oral.

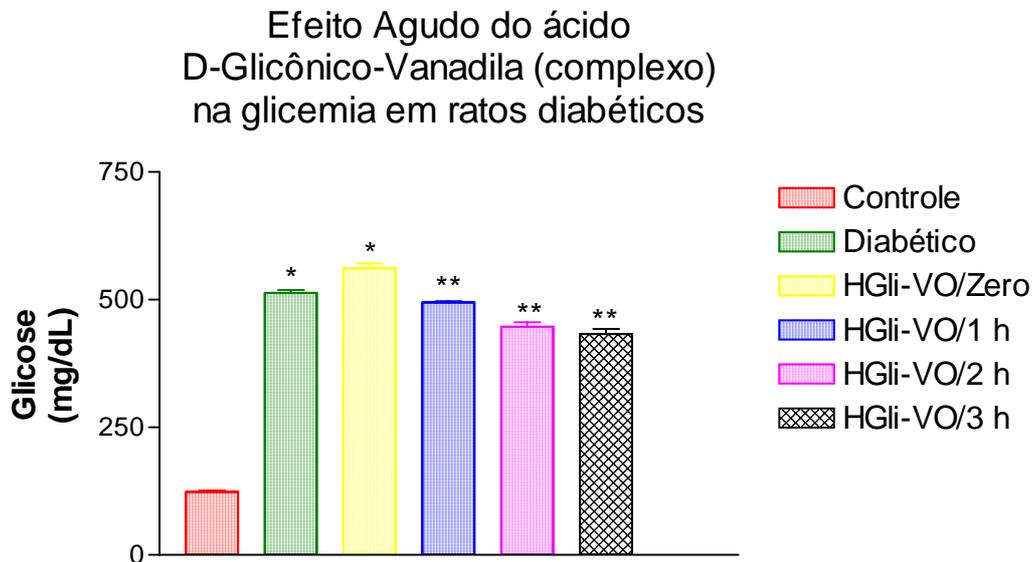
Tabela 7 - Efeito agudo do complexo HGli-VO em ratos diabéticos induzidos com aloxana^a.

	Níveis de glicose no sangue (mg/dL)			
Tempo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Hora (h)	Controle	Diabético	100 mg/Kg (via i. p.)	100 mg/Kg (via oral)
0	130,56 ± 2,3	504,60 ± 2,7	561,40 ± 9,7	482,16 ± 44,36
1	117,10 ± 1,7	487,30 ± 11,0	494,74 ± 2,5 ^b	395,0 ± 4,31 ^b
2	114,84 ± 6,3	536,60 ± 0,2	447,40 ± 8,8 ^b	497,0 ± 6,31
3	130,44 ± 3,9	524,30 ± 3,8	432,92 ± 9,6 ^b	456,0 ± 46,3

^a Os valores são expressos como ± S.E.M.; n=6 em duplicatas.

^b Diferença estatisticamente significativa para corresponder ao valor no tempo zero; $P \leq 0,05$.

IV.3.1 Estudo via intraperitoneal



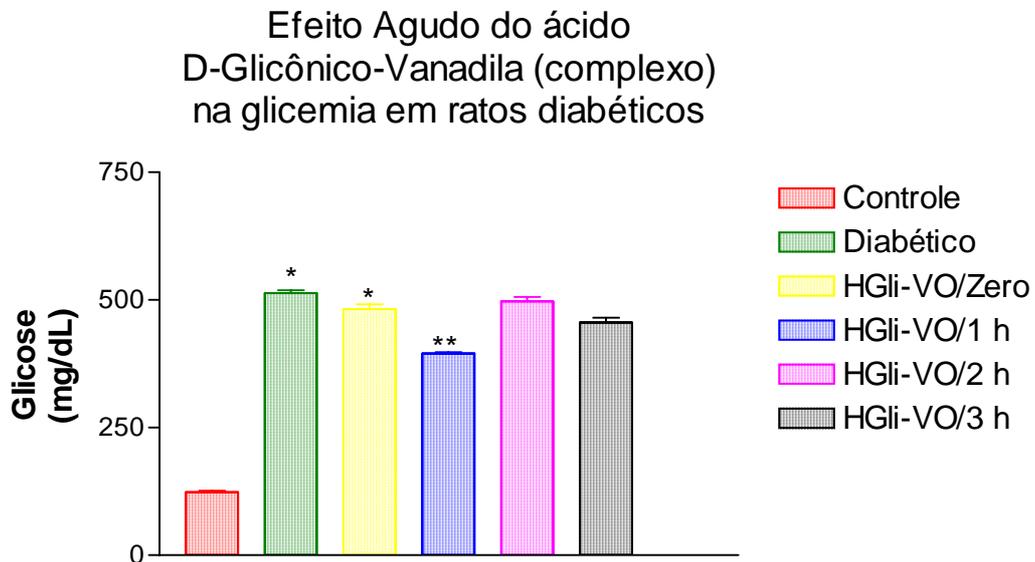
Ácido D-Glicônico-Vanadila (HGli-VO)
100 mg/Kg i.p. n=6 em duplicatas para
os grupos controles e diabéticos; n=3
em duplicatas para os grupos
tratados.*p<0.001 em relação ao
controle; **p<0.01 em relação ao tempo
zero.

Figura 23 - Efeito agudo do complexo HGli-VO via intraperitoneal na glicemia em ratos diabéticos, n = número de indivíduos.

O complexo HGli-VO (100 mg/Kg peso corporal) foi efetivo na diminuição da glicemia em ratos diabéticos. Este efeito hipoglicêmico foi observado num período agudo de tratamento entre 1 e 3 horas, produzindo uma diminuição de cerca de 23 % na glicemia.

A utilização do modelo experimental com ratos diabéticos e do tratamento via i. p. para avaliação biológica da ação do complexo nos permite sugerir que o efeito deste complexo, nesta dose e tempos estudados, provavelmente seja devido a uma ação direta do composto nos tecidos (tecido muscular, fígado, tecido adiposo, etc.), estimulando a captação da glicose para ser armazenada ou utilizada como fonte de energia.

IV.3.2 Estudo via oral



Ácido D-Glicônico-Vanadila (HGli-VO)
100 mg/Kg oral; n=6 em duplicatas para
os grupos controles e diabéticos; n=3
em duplicatas para os grupos
tratados. *p<0.001 em relação ao
controle; **p<0.04 em relação ao tempo
zero.

Figura 24 - Efeito agudo do complexo HGli-VO via oral na glicemia em ratos diabéticos, n = número de indivíduos.

Nos estudos realizados da ação do complexo (100 mg/Kg peso corporal) na glicemia de ratos diabéticos em períodos agudos de tratamento, observou-se um efeito hipoglicêmico (18 %) significativo em 1 hora de tratamento, sendo que nos períodos de 2 e 3 horas a glicemia retornou aos níveis similares aos verificados no tempo zero.

Foi detectado um efeito hipoglicêmico percentualmente similar por ambas as vias, entretanto, no tratamento via oral o efeito hipoglicêmico foi menos duradouro do que o observado para o tratamento i. p..

Estes resultados sugerem que há uma diferença em relação ao metabolismo do complexo HGli-VO entre a via oral e i. p., por isso, o estudo da integridade e o mecanismo de ação deste complexo neste período de tratamento de 1 a 3 horas merece ser investigado mais profundamente.

V - CONCLUSÕES

- O efeito quelante é mais evidente no açúcar de cadeia aberta, pois existe maior liberdade estérica para o açúcar coordenar-se ao metal.
- Em comparação ao íon zinco(II), o íon vanadila mostrou-se mais efetivo na coordenação com os açúcares estudados.
- Dos complexos estudados, o VO-HGli foi escolhido para a realização de testes biológicos em ratos, pois foi o único que se mostrou solúvel em toda a faixa de p[H] e possui apenas uma espécie no p[H] fisiológico.
- Durante o tratamento agudo (1 a 3 horas) o complexo HGli-VO diminuiu a glicemia em ratos diabéticos tratados com aloxana.
- Foi observado uma diminuição significativa da glicemia tanto via intraperitoneal como pela via oral, no entanto este efeito demonstrou ser mais prolongado através da via intraperitoneal.
- Estes resultados indicam que o complexo HGli-VO merece ser mais investigado quanto ao seu efeito hipoglicemiante, em doses e tempos distintos aos estudados neste trabalho e, também, quanto ao mecanismo de ação do complexo através do estudo do seu metabolismo tanto via oral como i. p.. Sugere-se que um dos possíveis mecanismos de ação seja por meio da captação da glicose pelo tecido muscular.

VI - BIBLIOGRAFIA

1. ALLEGRETTI, Y. et al., Oxovanadium(IV) complexes of quinic acid. Synthesis, characterization and potentiometric study. *Polyhedron*. **19** (2000)2613.
2. ATKINSON, M. A. and MacLAREN, N. K., What causes diabetes? *Sci. Am.*, **263** (1990)62-63, 66-71.
3. BANDWAR, R. P and RAO, C. P., Relative reducing abilities in vitro of some hydroxy-containing compounds, including monossacharides, towards vanadium(V) and molybdenum(IV). *Carbohydr. Res.*, **277** (1995)197.
4. BARAN, E. J., Vanadium detoxification. In: NRIAGU, J. O., Vanadium in the environment, Part 2. London: John Willey & Sons, 1998. p. 317.
5. BELL, C. F., *Principles and applications os metal chelation*. Clarendon press Oxford, 1977.
6. BRANCA, M. et al., Stabilization of the open-chain structure of D-Galacturonic acid in a dimeric complex with oxovanadium(IV), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1990)1997.
7. BRANCA, M. et al., Oxovanadium(IV) complex formation by simple sugar in aqueous solution, *J. Inorg. Biochem.*, **45** (1992)169.
8. COULSTON, L and DANDONA, P., Insulin-like effect of zinc on adipocytes. *Diabetes*, **29** (1980)665.
9. EADY, R. R. and LEIGH, G. F., Metals in nitrogenases. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **19** (1994)2739.

10. EMILIEEN, G., MALOTEAUX, J. M. and PONCHON, M., Pharmacological management of diabetes: recent progress and future perspective in daily drug treatment *Pharmacol. Ther.*, **1:81** (1999)37.
11. ESCANDAR, G. M. and SALAS, L. F., Complexes of Cu(II) with D-aldonic and D-alduronic acids in aqueous solution. *Can. J. Chem.*, **70** (1992)2053.
12. ESCANDAR, G. M. et al., Interaction of zinc(II) with D-aldonic acids in the crystalline solid and aqueous-solution. *Polyhedron*. **6/7** (1994)909.
13. ESCANDAR, G. M. SALAS, L. F. and SIERRA, Complexes os cobalt(II) and nickel(II) with D-aldonic acids in the aqueous solution. M. G., *Polyhedron*. **13** (1994)143.
14. ESCANDAR, G. M. et al., Interaction of divalent metal ions with D-Gluconic acid in the solid phase and aqueous solution. *Polyhedron*. **15** (1996)2251.
15. ETCHEVERY, S. B., WILLIAMS, P. A. M. and BARAN, E. J., Synthesis and characterization os oxovanadium(IV) complexes with saccharides. *Carbohydr. Res.*, **302** (1997)131.
16. FRUTOS, A. A. et al., Bismuth(III) complexes of D-Gluconic acid. Studies in aqueous solution and in the solid phase. *Polyhedron*. **18** (1999)989.
17. FURNAN, N. *Standard methods of chemical analysis*. Vol. 1. D. Van. Nortand Company Inc., 1962. p.1211-1213.
18. GYURCSIK, B and NAGY, L., Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. *Coord. Chem Rev.*, **203** (2000)81.

19. HENZE, M., *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **72** (1911)494.
20. HEYLIGER, C. E., WILLSKI, G. R., TAHILIANI, A. G. and McNEILL, J. H., Effect of vanadate on elevated blood-glucose and depressed cardiac-performance of diabetic rats. *Science*. **227** (1985)1474.
21. HUGHES, M. N. *The inorganic chemistry of biological processes*. 2nd ed. London: John Willey & Sons, 1972. cap. 10.
22. ISLAS-ANDRADE, S. et al., Streptozocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem. Cytochem.*, **33** (2000)201.
23. JAFRI, M. A. et al., Effect os *Punica granatum* Linn (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **70** (2000)309.
24. KAIWAR, S. P. and RAO, C. P., Soluble complexes of early first-row transition-metal ions with D-Glucose. *Carbohydr. Res.*, **237** (1992)203.
25. LEDERKREMER, R. M. and VARELA, O., *Hidratos de carbono*. The general secretariat organization of american states. Washington DC, 1988.
26. MARTELL, A. E. and MOTEIKAITS, R. J. *The determination and use of stability constants*. 2nd ed. New York: VCH publishers, 1992.
27. MICHIBATA, H, MYAMOTO, T. and SAKURAI, H., Purification of vanadium binding substance from blood-cells of tunicate, ascidia-sydneiensis-samea *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141** (1986)251.
28. PESSOA, L. F. C. et al., Oxovanadium(IV) and amino acids-I. The system L-alanine + VO²⁺; a potentiometric and spectroscopy study. *Polyhedron*. **14** (1988)1245.

29. REHDER, D., The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **30** (1991)148.
30. ROSSOTI, F. J. C. and ROSSOTI, H., *J. Chem. Educ.*, **42:7** (1965) 375.
31. SAKURAI, H. et al., insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **8** (1990)193.
32. SAKURAI, H and TSUJI, A. *Antidiabetic action of vanadium complexes in animals: blood glucose normalizing effect, organ distribution of vanadium, and mechanism for insulin-mimetic action.* In: NRIAGU, J. O. *Vanadium in the environment.* Londres: John Willey & Sons, 1998.
33. SAKURAI, H. et al., Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord. Chem. Rev.*, **000** (2001)1.
34. SCHWARTZENBACH, G. and FLASCHKA, H., *Complexometric titrations.* London: Methuen & Co. LTDA. 1969.
35. SMITH, R. M., MARTELL, A. E. and MOTOKAITIS, R. J., *NIST - Critical stability constants of metal complexes*, Nist - Database 46. Gaithersburg, MD, USA, 1994.
36. SMITH, T. S., LoBRUTTO, R and PERCORARO, V. L., Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems. *Coord. Chem Rev.*, **000** (2001)1.
37. SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G., In: *Statistical methods.* USA:The Iowa State University press, 1973. p. 172-175.
38. SREEDHARA, A., SRINIVASA, M. S. S. and RAO, C. P., Transition metal-saccharide interactions: Synthesis and characterization of vanadyl saccharides. *Carbohydr. Res.*, **264** (1994)227.

39. SREEDHARA, A., RAO, C. P. and RAO, B. J., Transition metal saccharide chemistry and biology: synthesis, characterization, electrochemistry and EPR studies of oxovanadium(IV) complexes of saccharides and their derivatives and in vitro interaction of some of these with ribonuclease and deoxyribonuclease. *Carbohydr. Res.*, **289** (1996)39.
40. THOMPSON, K. H., McNEILL, J. H. and ORVIG, C., Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem Rev.*, **99**(1999) 2561.
41. TSIANNI, E. and FANTUS, G., Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol. Metal.*, **8** (1997)51.
42. VALLEE, B. L., *Recent advances in zinc biochemistry*. In: ADDISON, A. W. et al., *Biological aspects of inorganic chemistry*. Vancouver: John Willey & Sons, 1977. p. 37-70.
43. WHO. *Diabetes Mellitus*, Reports of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series. (1985)727.
44. WILLSKI, G. R. et al., Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.*, **85** (2001)33.
45. YUEN, V. G. et al., Glucose-lowering properties of vanadium compounds: Comparison of coordination complexes with maltol or kojic acid as ligands. *J Inorg. Biochem.*, **68** (1997)109.