

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE DEXTRANA COM TERBIO(III) EM SOLUÇÃO.

SANDRA SOARES VASCONCELLOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INORGÂNICA, COMO  
REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1984

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Química Inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

SANDRA SOARES VASCONCELLOS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 02.03.84.

---

Dra. Judith Feitosa Rodrigues  
Orientadora da Dissertação

---

Dr. Fernando Galembeck  
Universidade Estadual de Campinas-SP.

---

Dr. João Aldésio Pinheiro Holanda  
Universidade Federal do Ceará.

---

Aos meus filhos, Marcelo e Fábio com muito amor.

O presente trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. JUDITH FEITOSA RODRIGUES do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a Professora Dra. Judith Feitosa Rodrigues, pela dedicação e orientação deste trabalho.

À Professora Dra. Adelaide Faljoni-Alário, pela colaboração nas medidas de rotação ótica e principalmente pela acolhida amiga no Instituto de Química da USP.

Ao Professor Dr. Fernando Galembeck, pela doação da Dextrana e pelas discussões.

À Professora Dra. Glaucione Gomes de Barros pela atenção e pelo apoio na realização dos trabalhos na USP.

À Professora Dra. Iracema Lacerda Machado, pela ajuda na caracterização da Dextrana.

À Universidade Federal do Ceará, em particular à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Inorgânica pelo apoio e consideração.

Aos Professores deste departamento principalmente aqueles que não só me cederam seus conhecimentos, mas também seu tempo e interesse.

Aos amigos e familiares, especialmente à minha mãe, pelo incentivo e dedicação.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CARBOIDRATOS.....	3
2.1. PROPRIEDADES GERAIS.....	3
2.1.1. MONOSSACARÍDEOS.....	4
2.1.2. PENTOSES.....	12
2.1.3. OLIGOSSACARÍDEOS.....	13
2.1.4. POLISSACARÍDEOS.....	16
2.1.4a. PROPRIEDADES GERAIS.....	16
2.1.4b. ESTRUTURA DE POLISSACARÍDEOS.....	27
2.2. COMPLEXOS METÁLICOS COM CARBOIDRATOS.....	35
2.2.1. METAIS - SIMPLES CARBOIDRATOS.....	35
2.2.2. METAIS - POLISSACARÍDEOS COMPLEXOS.....	44
3. DEXTRANA .....	52
3.1. PROPRIEDADES GERAIS.....	52
3.2. OBTENÇÃO.....	57
3.3. REATIVIDADE DAS DEXTRANAS.....	61
3.4. USOS.....	64
4. FLUORESCÊNCIA DOS ÍONS TERRAS RARAS.....	70
4.1. MECANISMOS DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPLEXOS DE TERRAS RARAS.....	70

	Página
4.2. CARÁTER DAS TRANSIÇÕES .....	74
4.3. CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM AS PROPRIEDADES DE FLUORESCÊNCIA .....	76
4.4. INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO ÍON .....	81
4.5. CASO ESPECÍFICO DA FLUORESCÊNCIA DO TÉRPIO(III)	84
4.6. FLUORESCÊNCIA DOS ÍONS TERRAS RARAS EM SIS - TEMAS BIOLÓGICOS .....	88
5. PARTE EXPERIMENTAL .....	92
5.1. REAGENTES .....	92
5.2. APARELHAGEM E METODOLOGIA .....	94
5.2.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	94
5.2.2. ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO .....	95
5.2.3. RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA .....	95
5.2.4. MEDIDAS DE pH .....	95
5.2.5. DISPERSÃO ÓTICA ROTATÓRIA .....	96
5.2.6. VISCOSIDADE .....	96
5.2.7. ESPALHAMENTO .....	96
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
6.1. INVESTIGAÇÃO DA ESTRUTURA DA DEXTRANA .....	98
6.1.1. RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA ( <sup>1</sup> HNMR) .....	98
6.1.2. INFRAVERMELHO .....	102
6.2. ESTUDO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO TÉRPIO(III)- DEXTRANA .....	105

	Página
6.2.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	105
6.2.1a. ESPECTRO DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO DO Tb(III)..	105
6.2.1b. INTENSIFICAÇÃO DO Tb(III) EM PRESENÇA DA DEXTRANA.....	108
6.2.1c. TITULAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE DEXTRANA COM Tb(III).....	110
6.2.1d. MECANISMO DE INTENSIFICAÇÃO DE FLUORES- CÊNCIA.....	116
6.2.1e. COMPARAÇÃO COM O ANÁLOGO DE BAIXO PESO MOLECULAR.....	122
6.2.1f. EFEITO DE OUTROS ÍONS METÁLICOS NA INTEN- SIDADE DE FLUORESCÊNCIA Tb(III)-DEXTRANA....	124
6.2.2. DISPERSÃO ÓTICA ROTATÓRIA.....	126
6.2.3. ESPALHAMENTO DE LUZ.....	133
6.2.4. VISCOSIDADE.....	137
7. CONCLUSÃO.....	140
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

## RESUMO

O estudo da interação de Tb(III) com dextrana em solução aquosa foi realizado através de espectroscopia de fluorescência, viscosidade, espalhamento e dispersão ótica rotatória.

Os resultados indicam a formação de um complexo evidenciado inicialmente pela intensificação de fluorescência do Tb(III) em presença da dextrana.

O mecanismo de intensificação é o mecanismo por excitação direta do íon metálico como proposto por KREHER e BUTTER<sup>(72)</sup>.

Neste trabalho são comentadas as possíveis causas desta intensificação, pesquisadas através da deuteração do solvente.

Tudo indica que o Tb(III) deve estar ligado a dextrana através dos grupos hidroxílicos que substituem parte das moléculas de água da esfera de coordenação do íon metálico.

Os resultados das medidas fluorimétricas sugerem que a razão molar a qual Tb(III) está ligado a dextrana ( $|Tb|/|Dex|$ ) é ~ 0.20, 0.38 e 0.43 para os sistemas a pHs 6.6, 4.4 e 3.0 respectivamente.

Foram feitas comparações com o  $\alpha$ -metil glicosídeo e os resultados das curvas de titulações fluorimétricas indicam que a interação do Tb(III) com dextrana é maior do que aquela com o seu análogo de baixo peso molecular.

Os estudos de O.R.D., espalhamento e viscosidade confirmam a formação do complexo Tb(III)-dextrana.

## ABSTRACT

The study of the interaction of Tb(III) with dextran in aqueous solutions was performed according to fluorescence spectroscopy, viscosity, light scattering and rotatory optic dispersion.

The results lead to the formation of a complex which was first evidenced by the intensification of the Tb<sup>3+</sup> fluorescence in presence of dextran.

The mechanism of the intensification is that of direct excitation of the metallic ion as proposed by KREHER and BUTTER<sup>(72)</sup>.

In this work, the probable causes of this intensification are discussed. Then these causes were investigated through the deuteration of the solvent.

It seems that the Tb(III) is bound to the dextran through the hydroxyl groups which take the place of part of the water molecules of the coordination sphere of the metallic ion.

The results of the fluorimetric measures suggest that the molar ratio of which Tb(III) is bound to dextran ( $|Tb|/|Dex|$ ), is  $\approx$  0.20, 0.38 and 0.43 for the systems with pHs 6.6, 4.4 and 3.0, respectively.

Comparisons were made with  $\alpha$ -methyl glucoside and the results of the fluorimetric titration curves show that the interaction between Tb(III) and dextran is stronger than that with the analogous of low molecular weight.

The studies of O.R.D., light scattering and viscosity confirm the formation of the complex Tb(III)-dextran.

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos íons metálicos ocorrem na natureza associados com colóides orgânicos, ligantes poliaromáticos que contêm grupos hidroxilas ou carboxilas que servem como sítios de ligação para esses metais.

O estudo da formação desses complexos tem sido fundamental para a compreensão de muitos processos biológicos. Particularmente o fenômeno da complexação do Ca(II) tem merecido especial atenção por seu papel essencial na regulação de muitos desses processos. (1,2)

ANGYAL (3-6) tem realizado muitos estudos para investigar a complexação de compostos polihidroxilados simples (entre estes açúcares e ciclitois) com muitos íons metálicos, entretanto pouco se tem notícia do comportamento dos polissacarídeos quando se trata do fenômeno da complexação.

A importância dos íons metálicos na química das proteínas é extensa e bem documentada. (7,8) No entanto na química de polissacarídeos, a função do íon metálico nos processos biológicos, não é tão bem definida.

Polissacarídeos podem afetar processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo indução da calcificação, controle no movimento de metabólitos, íons e água, cicatrização de feridas, etc... (9)

Num grupo de polissacarídeos muito especial estão as dex-

tranas, polímeros de D-glicose, muito conhecidos por sua utilização na prática clínica, como substituto do sangue. (10)

Além disso são conhecidos muitos complexos de Dextrana com vários íons metálicos que tem muitas aplicações, (11) principalmente na área da medicina. (12,13) O complexo de ferro-dextrana, é o mais conhecido deles, e é utilizado no tratamento de anemias. (11)

Talvez a primeira indicação que dextrana possa interagir com íons terras raras, tenha sido sugerida por SELYE e col. (14) que utilizaram complexos de Fe-dextrana, Al-dextrana e Cr-dextrana para prevenir intoxicação ou calcificação esplênica em ratos contra doses fatais de cloretos de terras raras.

A fim de constatar a interação entre dextrana e Tb(III) utilizamos a espectroscopia de fluorescência.

Este método foi escolhido por ser muito sensível a mudanças no envolvimento do íon metálico fluorescente, principalmente quando se trata de detectar fracas interações, como é o caso de interação entre íons metálicos com polissacarídeos neutros em solução aquosa. (15)

Em complementação ao nosso trabalho, apresentamos um breve estudo de rotação ótica, espalhamento e viscosidade, desde que os mesmos tem sido muito aplicados em estudos de sistemas semelhantes ao nosso.

## 2. CARBOIDRATOS

### 2.1. PROPRIEDADES GERAIS [16-21]

Os carboidratos são grupos de compostos orgânicos que em sua maioria possuem a fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ . O termo carboidrato é usado em geral para descrever polihidroxi aldeídos ou polihidroxi cetonas, conhecidos como aldoses ou cetoses respectivamente. Aldoses contêm o grupo  $-CH(OH)CHO$  e cetoses o grupo  $-CH(OH)C(O)CH(OH)-$ .

Quimicamente o termo carboidrato é sinônimo de açúcar, tendo este último ganhado maior popularidade em todo o mundo.

Juntamente com os lipídeos e as proteínas os carboidratos desempenham um papel fundamental na vida dos animais e das plantas. São fontes de energia para os organismos vivos, constituindo também um meio pela qual a energia química pode ser armazenada. Além disso, alguns carboidratos podem funcionar como unidades estruturais dentro da célula.

Carboidratos são necessários a nutrição humana e afetam o metabolismo mais profundamente do que se tinha suposto até bem pouco tempo. Vários são os caminhos metabólicos dos carboidratos e muitas investigações no campo clínico tem revelado o efeito do seu uso ou não no organismo humano. GREEN e WINCKLER<sup>(20)</sup>, em estudos recentes mostraram a relação entre a ingestão de carboidratos e o desenvolvimento de doenças do coração, "stress", níveis de neurotransmissores e acuidade mental. Algumas considerações levam a crer que certos carboidratos podem estar implicados

no desenvolvimento de doenças cardíacas desde que podem ser convertidos em gorduras e assim elevarem os níveis de triglicérides.

Quando o nível de glicose no sangue é reduzido, por exemplo, as mudanças nas atividades nervosas são prontamente perceptíveis. Uma relação entre a ingestão de carboidratos (e portanto elevado nível de glicose no sangue) e a habilidade para se enfrentar situações de stress também é comentada.

De um modo geral, os carboidratos podem ser divididos em 4 grupos, como se segue:

#### 2.1.1. Grupo 1 - Os monossacarídeos

Também chamado de açúcares simples, os monossacarídeos constituem numa só unidade polihidroxialdeídica ou cetônica. São classificados de acordo com o número de átomos de carbono, que possuem. As trioses possuem 3 átomos, as tetroses 4, as pentoses 5, hexoses 6.... e assim por diante até as nonoses. Cada uma ocorre em duas séries, isto é, aldotetroses, cetotetroses aldohexoses, ceto-hexoses etc...

Em ambas as classes dos monossacarídeos as hexoses são as mais abundantes. A figura 1, mostra como as aldohexoses podem ser derivadas da mais simples aldose assimétrica, o D-gliceraldeído, por aumento do número de grupos CHOH na cadeia da molécula.

As D-aldoses mais importantes biologicamente são: o D-gli

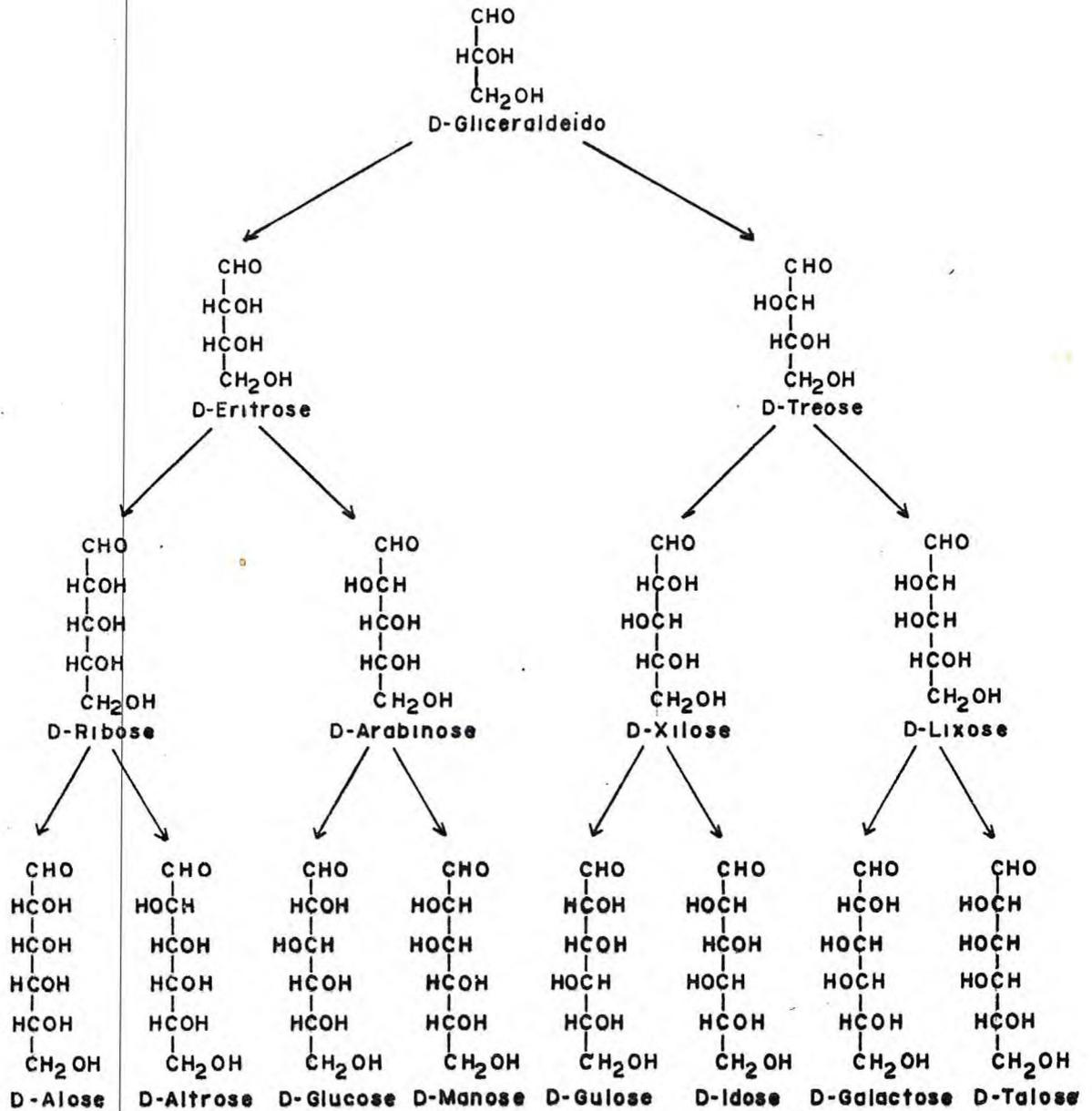


Figura 1 - As D-aldoses

ceraldeído, a D-ribose, a D-glicose, a D-manose e a D-galactose.

A figura 2 mostra as fórmulas de projeção das D-cetoses; todas possuem a mesma configuração no átomo de carbono assimétrico mais afastado do grupo carbonílico. As cetoses são as vezes designadas inserindo-se o ul dentro do nome da aldose correspondente: por exemplo, a D-ribulose é correspondente a aldopentose D-ribose. As cetoses biologicamente mais importantes são a diidroxiacetona, a D-ribulose e a D-frutose.

Deve ser lembrado que os símbolos D e L não tem relação com o fato dos açúcares serem dextro ou levorotatórios. A direção do desvio da luz é uma propriedade específica da molécula considerada. Ao isômero que desvia a luz na direção dos ponteiros do relógio deu-se o símbolo (+) como um prefixo indicador de sua condição de dextro-rotatório. O símbolo (+) ou (-) descreve o sinal do desvio (dextro ou levo) enquanto a letra D ou L indica a configuração ilustrada na Figura 3.



Figura 3 - D-gliceraldeído e L-gliceraldeído

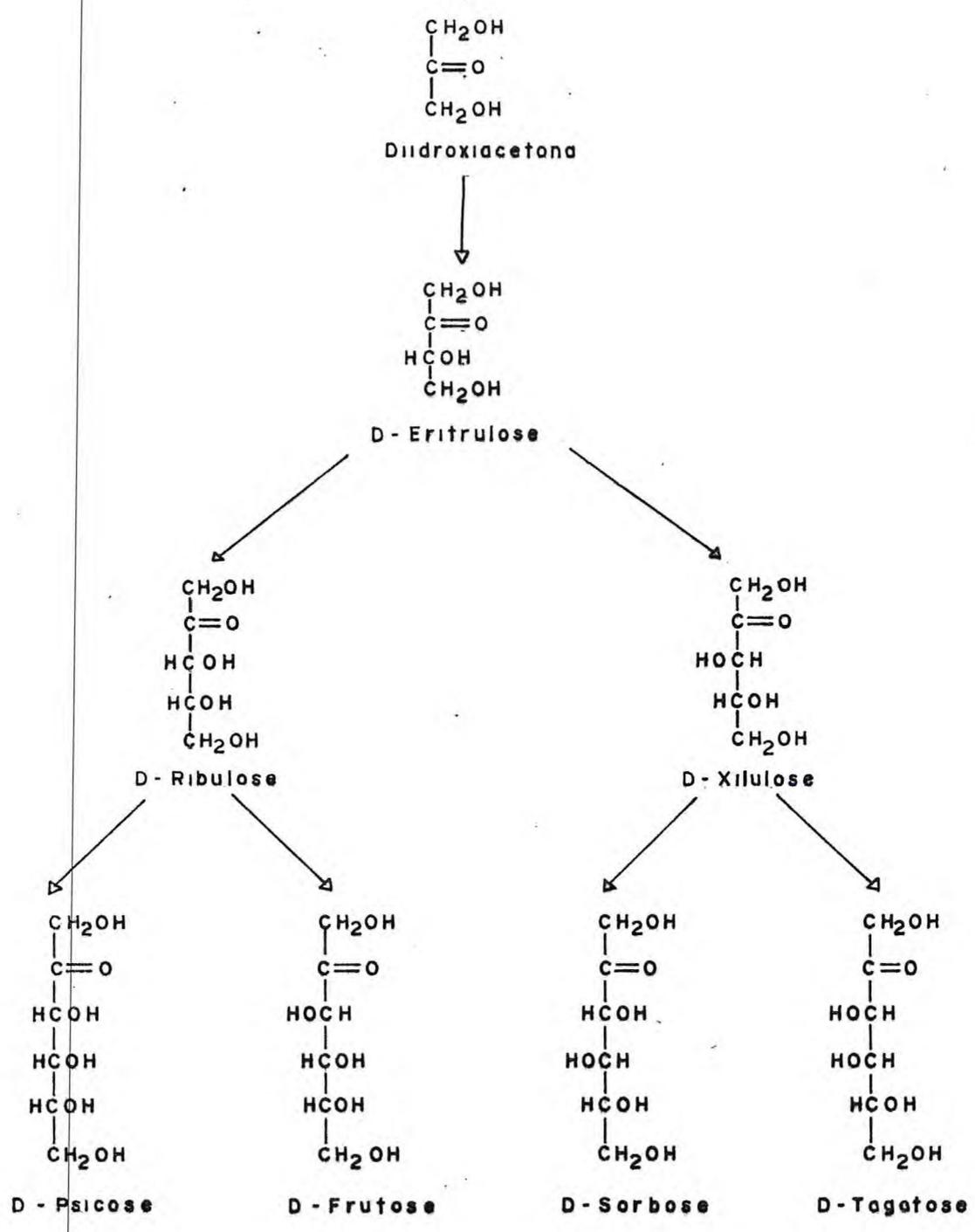


Figura 2- As D-cetoses

Para açúcares que contêm 2 ou mais átomos de carbono assimétrico adotou-se a convenção de que os prefixos D e L referem-se ao átomo de carbono assimétrico mais afastado do grupo funcional (CHO), como está exemplificado na Figura 4 para a glicose.



Figura 4 - D-glicose      L-glicose

Quando 2 açúcares diferem apenas na configuração ao redor de um átomo de carbono assimétrico específico são denominados epímeros entre si, como é o caso da D-glicose e da D-manose.

O monossacarídeo mais importante é a D-glicose e é o monossacarídeo fundamental de onde muitos outros são derivados.

A D-glicose é o principal combustível para a maioria dos organismos e o monomero primário básico dos polissacarídeos' mais abundantes como o amido e a celulose. A Dextrana também é constituída de unidades monoméricas de glicose.

A D-frutose também é um monossacarídeo dos mais importantes e assim como a D-glicose ocorre nas frutas e nos vegetais.

Muitos monossacarídeos se comportam em solução aquosa

como se possuíssem um centro assimétrico a mais do que indicam as fórmulas estruturais de cadeia aberta. A D-glicose, por exemplo, pode existir em 2 formas isoméricas diferindo na rotação específica, a  $\alpha$  D-glicose e a  $\beta$  D-glicose. É o chamado fenômeno da mutarrotação. A partir de várias considerações químicas concluiu-se que não são estruturas de cadeia aberta, mas estruturas de 6 elementos formadas pela reação de um grupo hidroxílico alcoólico do átomo de C-5 com o átomo do carbono aldeídico.

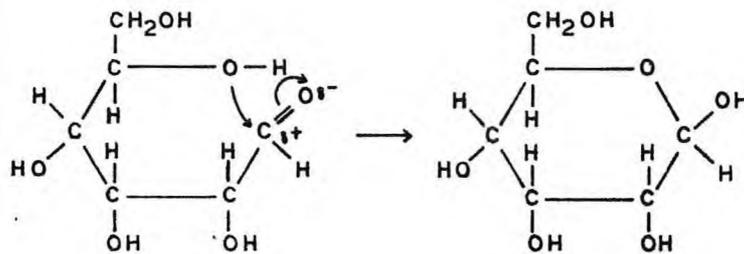


Figura 5 - Formação da estrutura cíclica das piranoses.

Os açúcares de estruturas cíclicas formados por anéis de 6 elementos são denominados piranoses e os formados por anéis de 5 elementos são denominados furanoses desde que derivam do pirano e do furano respectivamente.

O nome sistemático para a forma cíclica da  $\alpha$ -D-glicose é a  $\alpha$ -D-glicopiranoose. Portanto, a D-glicopiranoose pode existir como 2 estereoisômeros diferentes designados por  $\alpha$  e  $\beta$ .

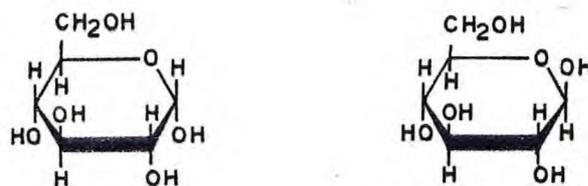


Figura 6a) -  $\alpha$ -D-glicose      b)  $\beta$ -glicose

Este par de diastereoisômeros (a) e (b) diferem somente na configuração ao redor do átomo de carbono assimétrico terminal e são chamados anomeros.

Embora fosse definidos antecipadamente os carboidratos como polihidroxi aldeídos ou polihidroxi cetonas, a maioria dos monossacarídeos de ocorrência natural não possuem grupamentos carbonílicos livres e são mais propriamente definidos como polihidroxiacetais ou cetais.

Os glicosídeos, são cetais assimétricos mistos formados pela reação do átomo de carbono anomérico do hemiacetal intramolecular, ou forma piranoose de aldohexose, com um grupo hidroxílico alcoólico. Esta é a denominada ligação, glicosídica. Nos glicosídeos o carbono anomérico é assimétrico. A D-glicose produz com metanol um  $\alpha$ -metil-D-glicopiranosídeo mostrado na Figura 7.

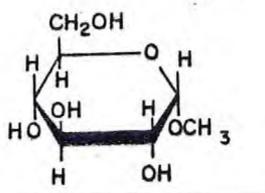


Figura 7 -  $\alpha$ -metil glicosídeo

As fórmulas cíclicas dos monossacarídeos podem ser representadas de maneira geral de acordo com a projeção de HAWORTH, como temos exemplificado até agora.

Os anéis das piranoses podem adotar a conformação denominada "barco" ou "cadeira". A forma em cadeira, que é relativamente rígida, é mais estável que a forma em barco e predomina nas soluções aquosas (Figura 8).

Os grupos substituintes na forma em cadeira não são geométrica e quimicamente equivalentes, eles surgem em 2 classes, axial e equatorial.

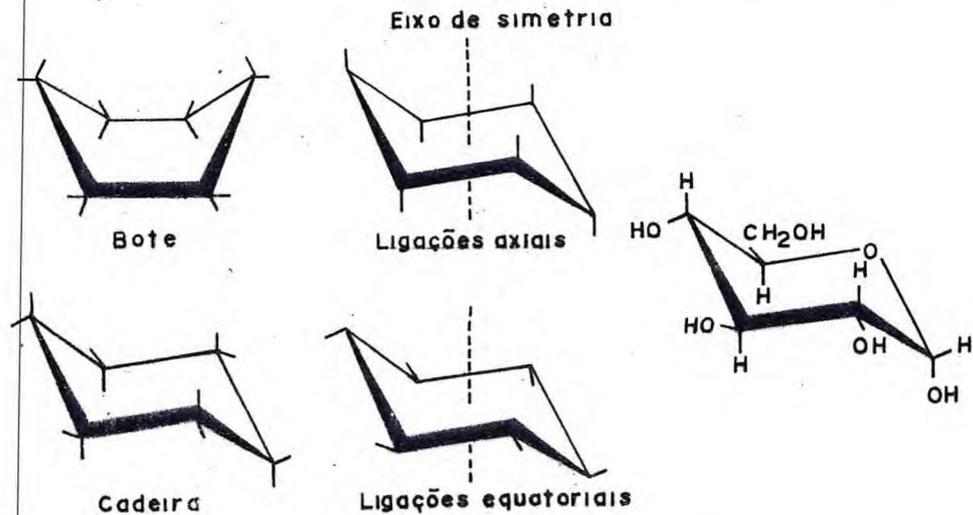


Figura 8 - Formas em cadeiras e em canoas dos anéis de 6 membros.

Os grupos hidroxílicos equatoriais das piranoses são mais prontamente esterificados que os grupos axiais.

### 2.1.2. Grupo 2 - As pentoses

Embora possam pertencer ao 1º grupo, as pentoses ( $C_5H_{10}O_5$ ) tais como a D-ribose e a 2-deoxe-D-ribose constituem um grupo especial.

As riboses não existem substancialmente na sua forma livre nos alimentos. No entanto, ocorrem nos ácidos nucleicos, RNA e DNA e nos compostos de alta energia tal como trifosfato de adenosina (ATP).

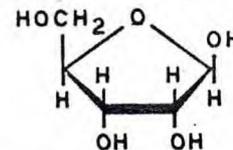
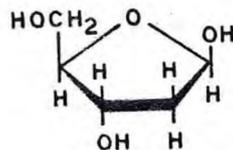


Figura 9 - 2-Deoxiribose

D-ribose

### 2.1.3. Grupo 3 - Oligossacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza são polissacarídeos, glicosídeos nos quais um grande número de unidades de monossacarídeos estão unidas, através de átomos de oxigênio de um dos grupos hidroxílicos a posição 1 (ou final reductor) de outro.

Hidrólise de tais polissacarídeos podem produzir monossacarídeos, como também dissacarídeos ou oligossacarídeos, os quais se constituem de até cerca de 8 ou 9 monossacarídeos.

Os dissacarídeos mais importantes na natureza são, a maltose, celobiose, lactose e sacarose.

A maltose possui 2 resíduos de D-glicose. Uma molécula de D-glicose se liga pelo grupo hidróxido no C-1 ao hidróxido do C-4 de uma segunda molécula de glicose. Diz-se portanto que esse dissacarídeo tem 1 ligação glicosídica  $\alpha$  1-4. Ambas as meias-glicoses estão na forma de piranose e a configuração do átomo de carbono anomérico é  $\alpha$ . A maltose, portanto, pode ser chamada de  $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

O segundo resíduo da glicose da maltose possui um átomo de carbono anomérico livre capaz de existir nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ , das quais a forma  $\beta$  predomina na natureza. O primeiro resíduo não pode sofrer oxidação, mas o segundo resíduo pode e é denominado extremidade redutora.

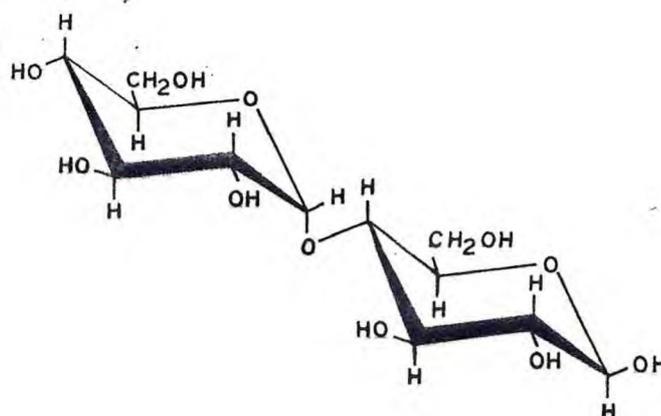


Figura 10 - Maltose

A celobiose é idêntica a maltose exceto por possuir uma ligação glicosídica  $\beta$  1-4. É um produto da hidrólise do polissacarídeo celulose e pode ser denominado também  $\beta$ -D-glicopiranosil (1-4)  $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

O dissacarídeo lactose ( $\beta$ -D-galacto piranosil (1-4)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) é encontrado no leite, não tendo outra ocorrência na natureza. Sua hidrólise produz D-glicose e D-galactose.

A sacarose é um dissacarídeo de glicose e de frutose ( $\beta$ -D-frutofuranosil (2-1)  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) extremamente abundante no reino vegetal e componente importante da cana de açúcar e da beterraba.

Em contraste com a maioria dos oligossacarídeos, a sacarose não possui átomos de carbono anomérico livre e por esta razão não sofre o fenômeno da mutarotação. Não age como açúcar redutor.

A hidrólise da sacarose é frequentemente denominada in-

versão, uma vez que é acompanhada de uma alteração efetiva na rotação ótica de dextro para levo.

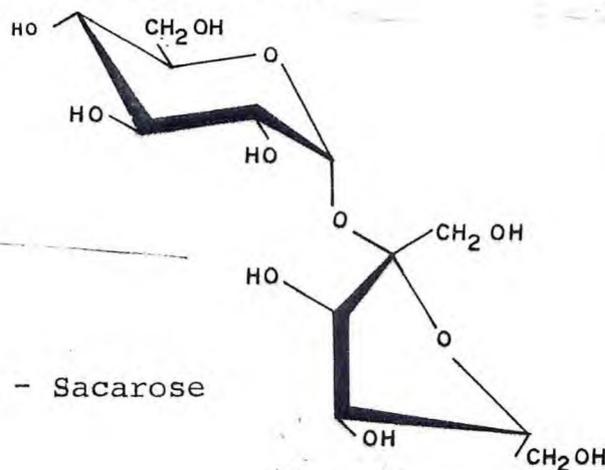


Figura 11 - Sacarose

As possibilidades estruturais para os dissacarídeos são muitas. Quanto maior o número de unidades monoméricas de um oligossacarídeo maiores são as variações estruturais que podem acontecer. Algumas vezes ocorrem ligações ramificadas como é o exemplo deste trissacarídeo-malezitose.

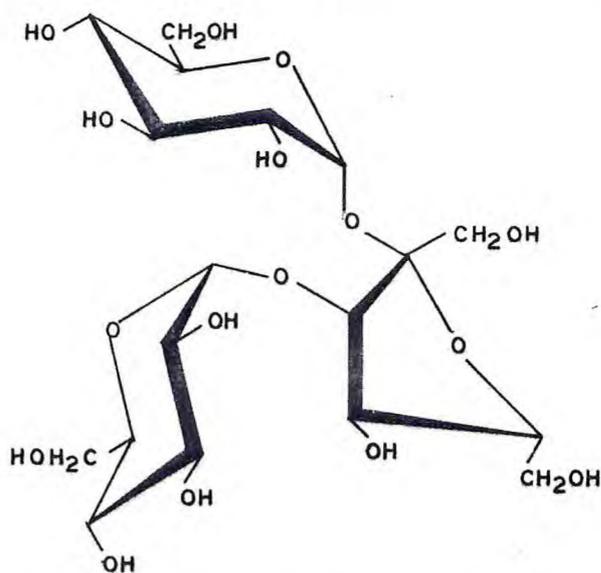


Figura 12 - Malezitose

#### 2.1.4. Grupo 4 - Polissacarídeos

##### 2.1.4a. Propriedades gerais

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas por polimerização de açúcares simples (monossacarídeos) ou seus derivados (ácidos urônicos, aminoaçúcares etc...). São largamente distribuídos nas plantas e nos animais e tem função estrutural ou nutritiva.

As unidades monoméricas de que se constituem os polissacarídeos podem ser todas idênticas ou pertencerem a um certo número de classes diferentes. Neste último caso é frequente que o polímero esteja constituído por combinações repetidas que podem adotar uma disposição repetitiva e regular.

Os vários polissacarídeos podem diferir não somente na sua composição, mas nos seus pesos moleculares (que podem variar de poucas dezenas até milhões), na natureza de suas uniões glicosídicas, na sua configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), na linearidade ou ramificação de suas cadeias.

A classificação usual dos polissacarídeos leva em conta sua natureza estrutural. Eles são divididos em homopolissacarídeos, que contém apenas um único tipo de unidade monomérica e em heteropolissacarídeos, que contém duas ou mais unidades monoméricas diferentes. Em ambas as classes os polímeros podem ser lineares ou ramificados.

Aos homopolissacarídeos, são dados nomes de classes, in-

dicando-se a natureza de seus monômeros primários. Por exemplo, os que contêm unidades de D-glicose, tais como o amido e o glicogênio são chamados de glucanos, e os que possuem unidades de manose são mananos. Os homoglucanos de ácidos urônicos (unidades estruturais derivadas das aldoses por transformação do grupo alcoólico primário em grupo -COOH) são chamados glucoronanos.

Uma classe muito importante de heteroglucanos está formada por ácidos urônicos e aminoaçúcares; e se denominam mucopolissacarídeos.

A Tabela 1 relaciona alguns dos mais conhecidos polissacarídeos com as suas unidades estruturais e o tipo de ligação entre suas unidades monoméricas.

Tabela 1 - Polissacarídeos mais conhecidos e unidade estrutural que os contém.

Celulose	$4\beta$ gli 1- $4\beta$ gli 1
Amilose	$4\alpha$ gli 1- $4\alpha$ gli 1
Amilopectina	$4\alpha$ gli 1- $4\alpha$ gli 1 ...1- $4\alpha$ gli 1-6
Glicogênio	$4\alpha$ gli 1- $4\alpha$ gli 1 ...1- $4\alpha$ gli 1-6
Dextrana	$6\alpha$ gli 1- $6\alpha$ gli 1 ou $6\alpha$ gli 1- $6\alpha$ gli 1 ... $6\alpha$ gli 1-4                      ... $6\alpha$ gli 1-3
Quitina	$4\beta$ agli 1- $4\beta$ agli 1
Ácido algínico	$(4\beta$ man 1- $4\beta$ man 1) <sub>n</sub> - $(4\alpha$ gli 1- $4\alpha$ gli 1) <sub>n</sub> ou $4\beta$ man 1- $4\alpha$ gli 1 <sub>n</sub>
Ácido hialurônico	$(4\beta$ gli 1- $3\beta$ agli 1) <sub>n</sub>
Substâncias pecticas	$(4\alpha$ MeG 1- $4\alpha$ MeG 1) <sub>n</sub> X 1- $(4\alpha$ MeG 1- $4\alpha$ MeG 1) <sub>n</sub>
K-carraggenan	$4\beta$ galSO <sub>4</sub> 1- $4\beta$ Agal 1- $4\beta$ gal SO <sub>4</sub> 1

D-glicose = gli/ácido D-manurônico = Man/ácido L gulurônico = gul  
 Metil-D-galactoronato \* MeG/ X = D-galactose, D-ramanose ou L arabinose.  
 D-galactose-sulfato = GalSO<sub>4</sub>/ 3,6 anidrido D-galactose = Agal  
 N acetil D-glucosamina = Aglu/ ácido D-glucorônico \* Gluc.

Os polissacarídeos mais importantes serão descritos em termos de sua função biológica.

### Polissacarídeos de reserva

Esses polissacarídeos, dos quais o amido é o mais abundante nas plantas e o glicogênio nos animais, são em geral depositados no citoplasma das células, na forma de granulos de grande tamanho. Nos eventuais excessos de glicose, suas unidades são armazenadas, através de ligações enzimáticas nas extremidades das cadeias de amido ou glicogênio; nas eventuais necessidades metabólicas, elas são liberadas enzimaticamente para uso como combustível.

O amido é constituído de 2 componentes, amilose e a amilopectina que variam em suas quantidades de acordo com a fonte da qual o amido é obtido.

Amilose consiste principalmente de cadeias lineares de cerca de 4.000 unidades de glicose ligadas por  $\alpha$  1-4 e peso molecular  $\approx 5 \times 10^5$ . (19)

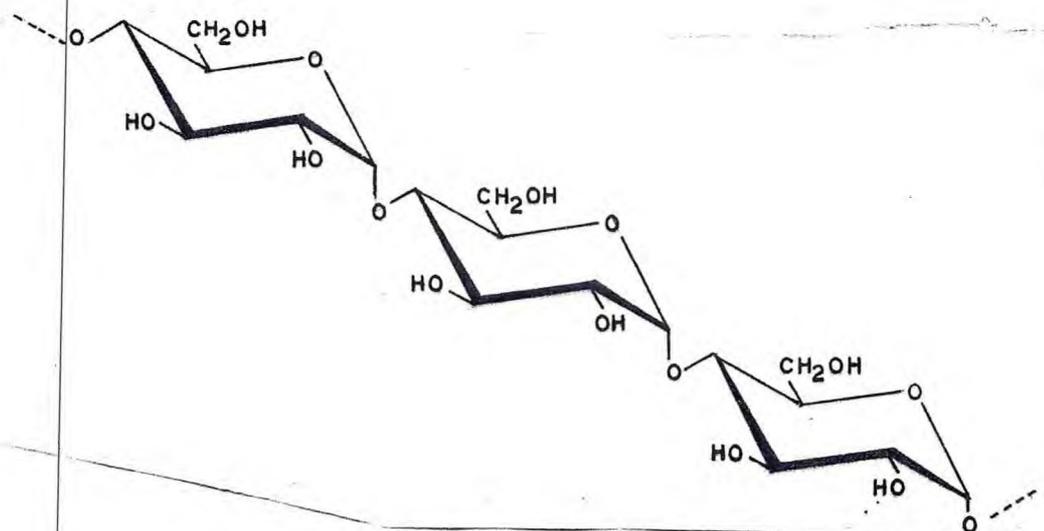


Figura 13 - Amilose

Amilopectina tem peso molecular muito mais alto ( $\approx 10^8$ ) e tem cadeias ramificadas através de ligação  $\alpha$  1-6.

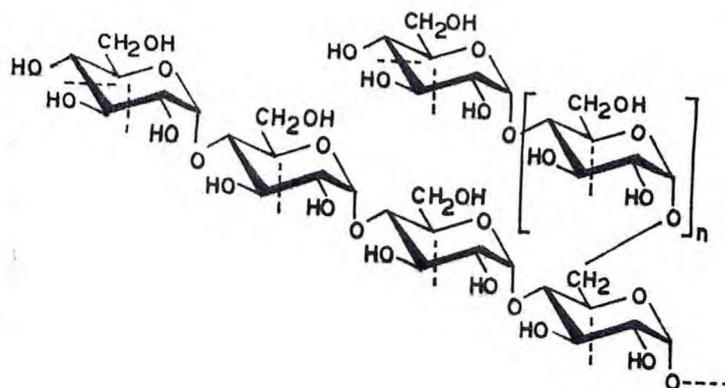


Figura 14 - Amilopectina

O glicogênio é semelhante a amilopectina, sendo portanto uma cadeia ramificada. O comprimento da cadeia, entretanto é menor (10 a 20 unidades de glicose) o que indica que a molécula do glicogênio é muito mais ramificada. Sua estrutura pode ser representada do seguinte modo, onde cada círculo corresponde a uma unidade de glicose.

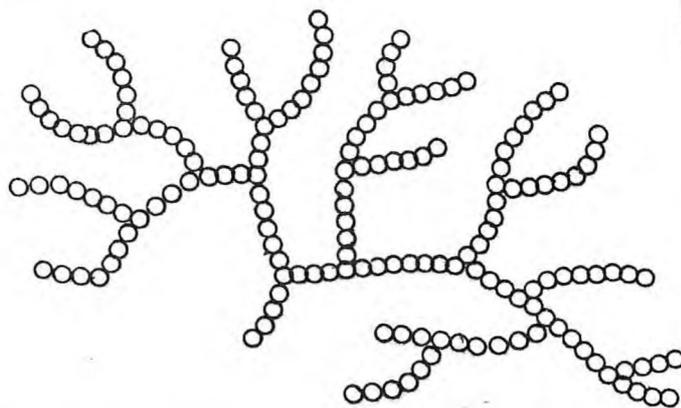


Figura 15 - Glicogênio

As dextranas são classificadas entre os polissacarídeos de reserva e são encontradas nas leveduras e nas bactérias, geralmente como polímeros ramificados.

As frutanas (também chamadas levanas, são homopolissacarídeos formados de unidades de D-frutose e são encontradas em muitos vegetais. A inulina, encontradas na alcachofra, consiste em resíduos de D-frutose em ligação  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1). As mananas são homopolissacarídeos de manose encontrados em bactérias, leveduras, bolores e em vegetais superiores. Analogamente, as xilanas e arabinanas são homopolissacarídeos encontrados em tecidos vegetais.

Tabela 2 - Polissacarídeos de reserva, unidade estrutural e ocorrência

Polissacarídeo	Unidade estrutural	Ocorrência
Amido amilose e amilopectina	D-glicose	Plantas
Glicogênio	D-glicose	Animais
Dextrana	D-glicose	Leveduras, bactérias
Levanas	D-frutose	Vegetais
Inulina	D-frutose	Alcachofra
Mananas	Manoses	Bactérias, leveduras e vegetais superiores
Xilanas	Xiloses	Vegetais
Arabinanas	Arabinoses	Vegetais

### Polissacarídeos estruturais

Muitos polissacarídeos servem primariamente como elementos estruturais nas paredes e nos envoltórios celulares, nos espaços intercelulares e no tecido conjuntivo, onde eles dão forma, elasticidade ou rigidez aos tecidos vegetais e animais, bem como proteção e suporte aos organismos unicelulares. As paredes e os envoltórios celulares não apenas são importantes na manutenção da estrutura dos tecidos, mas também possuem importantes locais de reconhecimento célula-célula específicos, na morfogênese dos tecidos e dos órgãos. Podem conter outros elementos protetores, tais como os anticorpos das superfícies dos tecidos vertebrados.

Por esta razão os polissacarídeos estruturais serão tratados como componentes das paredes celulares dos vegetais e das paredes celulares bacterianas.

### Paredes celulares dos vegetais

Nos vegetais e nas árvores de grande porte, as paredes celulares precisam não apenas contribuir para a força física ou rigidez dos tecidos do caule, das folhas e da raiz, mas também precisam ser capazes de sustentar grandes pesos.

O polissacarídeo mais abundante responsável pela estrutura e pela parede celular no reino vegetal, é a celulose. A celulose é o principal constituinte da madeira e por conseguinte, do papel, o algodão é quase que celulose pura. Ela é também en-

contrada em alguns invertebrados inferiores sendo que sua ocorrência é quase inteiramente extracelular. A celulose é um polissacarídeo linear constituído apenas de unidades de glicose unidas por ligações  $\beta$  1-4 e de peso molecular variável entre 200.000 a 2.000.000

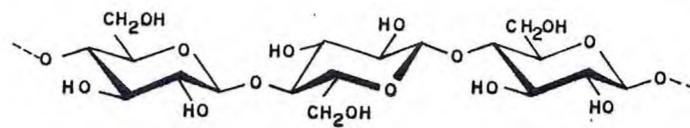


Figura 16 - Celulose

Outros materiais poliméricos relacionados às paredes celulares dos vegetais são: hemilose, pectina e extensina. As hemiloses são constituídas de pentoses especialmente as D-xilanas que são polímeros de D-xilose em ligação  $\beta$  (1-4) com as cadeias laterais de arabinose e outros açúcares. A extensina, uma glicoproteína e a pectina é um polímero de metil D-galactoronato complexo que está ligada covalentemente a celulose. A extensina, semelhante a sua contraparte colágeno no tecido animal, é rica em resíduos de hidroxiprolina.

Entre outros polissacarídeos que servem como parede celular e/ou como componente estrutural dos vegetais estão o ágar, das algas, o ácido alginico, das algas e das plantas marinhas e a goma arábica.

Paredes celulares bacterianas

As paredes celulares de algumas bactérias consistem de materiais polissacarídeos. Essas paredes bacterianas tem sido intensivamente estudadas, pois elas contêm antígenos específicos no diagnóstico de doenças infecciosas e porque a biossíntese das paredes celulares é inibida pela penicilina e por outros antibióticos de utilidade na medicina.

Exemplos deste último tipo são os polissacarídeos isolados de um determinado tipo de cepa de pneumococcus III, que consiste de uma cadeia alternada de D-glicose-piranosose e moléculas de ácido glucorônico, unidas por ligações 1-3. Estes polissacarídeos, quando separados de suas células bacteriais, produzem a mesma reação anticorpo nos animais como nas bactérias intactas e seu estudo é muito importante para o entendimento dos mecanismos de imunização.

Tabela 3 - Polissacarídeos estruturais, resíduos principais e ocorrência

Polissacarídeo	Resíduos principais	Ocorrência
Celulose	Glicose	Vegetais
Hemilose	D-xilose-D-arabinose e outros açúcares	Parede celular dos vegetais
Pectina	Metil-D-galactoronato	Parede celular dos vegetais

Quitina	N-acetil-glicosamina	Crustáceos
Ágar	D e L galactose, alguns esterificados com $H_2SO_4$	Algas
Ácido alginico	Ácido D-manurônico	Algas e plantas marinhas
Goma arábica	D-galactose e ácido D-glicorônico, arabinose e raminose	Vegetais

A parede celular de determinadas células animais é constituída de um envoltório que contém polissacarídeos de grande importância tais como, glicoesfingolipídeos, mucopolissacarídeos, ácidos e glicoproteínas.

Os glicoesfingolipídeos são complexos de lipídeos que contém um ou mais resíduos de açúcar neutro e estão presentes em grande quantidade no cérebro e no tecido nervoso.

Os mucopolissacarídeos são um grupo de heteropolissacarídeos relacionados, contendo em geral dois tipos de unidades monossacarídicas alternadas, das quais, pelo menos uma possui um grupamento ácido, ou um grupamento carboxílico ou sulfúrico. Quando aparecem complexionados com proteínas são denominados mucoproteínas, que são substâncias gelatinosas, viscosas, ou escorregadiças; algumas proporcionam lubrificação e outras agem como um cimento intracelular flexível.

O mucopolissacarídeo ácido mais abundante é o ácido hialurônico, a unidade repetitiva é um dissacarídeo formado de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina.

Outros mucopolissacarídeos são, a condroitina e seus derivados condroitina-4-sulfato, e condroitina-6-sulfato que são os componentes estruturais mais importantes dos envoltórios celulares, das cartilagens, dos ossos, da córnea e de outras estruturas do tecido conjuntivo dos vertebrados.

A heparina, que impede a coagulação do sangue e é encontrada nos pulmões e nas paredes das artérias, é também um mucopolissacarídeo.

As glicoproteínas estão entre as diversas classes de proteínas conjugadas e são encontradas em todas as formas de vida. Nos vertebrados, as glicoproteínas são na sua maioria extracelulares em ocorrência ou função ou são excretadas pelas células.

Entre as glicoproteínas temos o colágeno, a ovalbumina, o fibrinogênio, a pepsina, hormônio folículo-estimulante, etc...

#### 2.1.4b. Estrutura de polissacarídeos

A estrutura primária de um polissacarídeo é definida por sua constituição e propriedades configuracionais. Ou seja, uma compreensão da estrutura primária do polissacarídeo implica no conhecimento da sua composição em termos das unidades estruturais que os compõem e da descrição dessas unidades estruturais.

A variação na arquitetura molecular é manifestada por suas propriedades físicas e químicas. Portanto é importante considerar nesta etapa o conceito da polidispersividade, tendo em vista que estamos tratando de polissacarídeos.

Uma solução é dita monidispersa quando todas as porções da amostra apresentam as mesmas propriedades físicas ou químicas. Quando há variação nestas propriedades então a solução é dita polidispersa.

Variações na estrutura primária dos polissacarídeos são esperadas pelo fato de que a polidispersividade é uma consequência das mudanças que ocorrem durante o isolamento destes polissacarídeos de sua fonte natural.

Uma das manifestações da polidispersividade nas preparações de polissacarídeos é a distribuição do peso molecular. Como resultado somente podemos obter uma média de peso molecular para um polissacarídeo. Os diferentes tipos de médias dependem do método de determinação de peso molecular.

A estrutura do glicogênio, como já tivemos oportunidade

de mencionar é composta de unidades de glicose contendo uma média de cerca de 12 resíduos de D-glicose ( $\alpha$  1-4) ligados através de uma estrutura altamente ramificada. Os pontos de ramificação envolvem ligações glicosídicas  $\alpha$ (1 6).

Essas ramificações podem ser variadas dependendo de sua localização dentro da molécula. Portanto, na preparação de qualquer glicogênio em particular, a força das cadeias dos resíduos  $\alpha$ (1-4) glicosídeos e a posição precisa de seus pontos de ramificação nas suas cadeias estão sujeitas a certa quantidade de variações desordenadas. Teoricamente o número de moléculas de glicogênio distinguíveis na preparação de peso molecular  $10^7$  é muito maior do que  $10^{2.000}$ . Evidentemente a molécula de glicogênio, como qualquer outro polissacarídeo, é com certeza quimicamente polidispersa.

Alguns heteropolissacarídeos lineares exibem um padrão estrutural primário regular ao longo de suas cadeias e neste caso é permitido discutir suas estruturas primárias em termos de suas unidades repetitivas.

Como exemplo temos a Figura 17 que mostra o polissacarídeo mais estudado do tecido conectivo, que é o ácido hialurônico. Logo abaixo a descrição de sua estrutura primária.

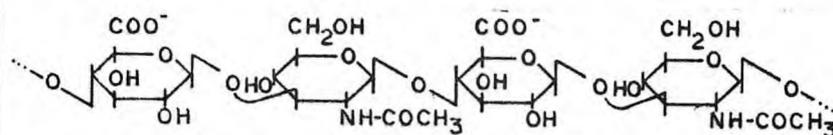


Figura 17 - Ácido hialurônico

No ácido hialurônico a unidade repetitiva está formada por ácido glucorônico e N-acetil glucosamina. Os enlaces interglucosídicos são  $\beta(1-3)$  e  $\beta(1-4)$  alternados.

Quando a molécula de um polímero apresenta uma disposição espacial regular e periódica em sua cadeia principal diz-se que tem estrutura secundária.

Uma estrutura secundária está completamente definida diante de determinação das distâncias interatômicas, ângulos de ligação e suas orientações.

A conformação de uma cadeia polimérica de conhecida estrutura primária é usualmente empregada quando se trata de definir a estrutura secundária.

As propriedades conformacionais de oligossacarídeos e polissacarídeos são determinados: a) pela conformação dos resíduos monossacarídeos individuais; b) pela conformação relativa dos respectivos pares de monossacarídeos ligados glicosidicamente um ao outro.

A maioria dos monossacarídeos (D-glicopirranose, D-galactopirranose, D-manopirranose e D-xilopirranose) que ocorrem nos polissacarídeos existem com a conformação  ${}^4C_1$

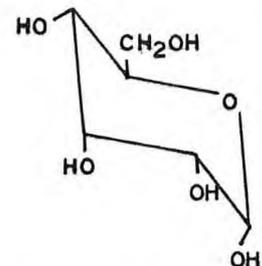


Figura 18 -  $\alpha$ -D-alopirranose na conformação  ${}^4C_1$

Podemos considerar o exemplo de um resíduo de celulose, a celobiose para mostrar as variáveis que podem definir a sua conformação.

Entre estas variáveis estão os ângulos de torção definidos na Figura 19 pelos parâmetros  $\phi$  e  $\psi$  os quais estão relacionados com o ângulo de torção entre  $C_1 - H_1$  e  $O_4' - C_4'$ , e entre  $C_4' - H_4'$  e  $O_4 - C_1$ , respectivamente.

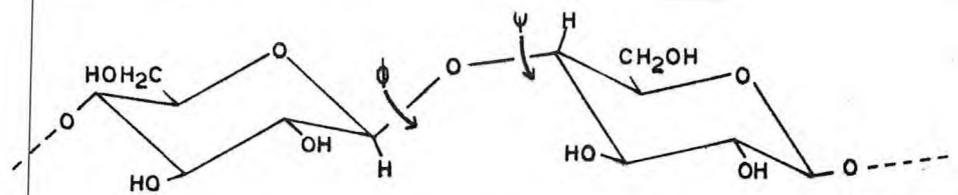


Figura 19 - A definição dos parâmetros  $\phi$  e  $\psi$  para o resíduo de celobiose

Teoricamente são possíveis muitas conformações para o resíduo de celobiose. Quando todas essas possibilidades são consideradas a intervalos de  $10^\circ$  para ambos  $\phi$  e  $\psi$  (totalmente permitidas) e 21 (marginalmente permitidas) dando um total de  $36^2$  (ou 1296) conformações foram obtidas.

Considerando que 96% das conformações relativas dos resíduos das ligações glicopiranosídicas  $\beta(1-4)$  não são permitidas, não é surpresa de que a cadeia da celulose seja de certa forma inflexível.

A exploração de todas as possíveis conformações da celulose indicam que apenas uma conformação é inteiramente livre de interações não ligantes.

A conformação de "Hermans" ( $\approx 25^\circ, 146^\circ$ ) para cada  $(\phi, \psi)$  representa a estrutura mais provável para a celulose, caracterizando uma hélice com dois resíduos monossacarídeos por turno (Figura 20).

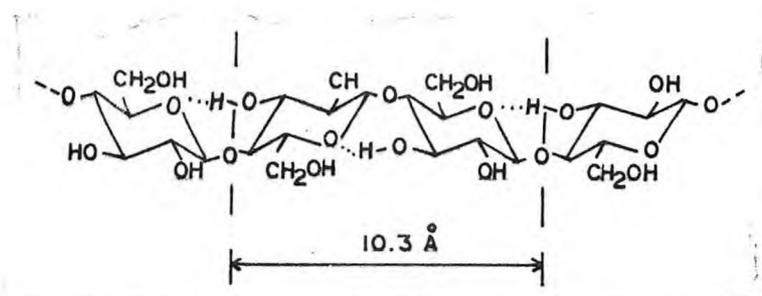


Figura 20 - Conformação de Hermans da celulose.

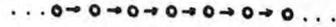
Os métodos usados para determinação da estrutura de moléculas de polissacarídeos são análogos aos usados para os oligossacarídeos, mas os resultados geralmente são mais difíceis de interpretar, especialmente se o polissacarídeo é ramificado ou cíclico.

A determinação da disposição das unidades estruturais é uma questão distinta e portanto é de se esperar métodos particulares cujos objetivos são para o conhecimento de:

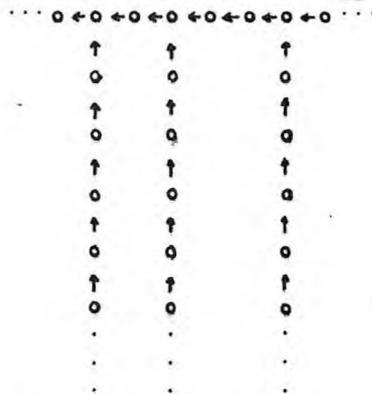
- a) os tipos de união interglicosídicas, ou seja, que grupos de OH estão estabelecidos e qual a sua configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ).
- b) a unidade repetitiva, no caso de polissacarídeos formados por mais de um tipo de monossacarídeos.
- c) o caráter linear ou ramificado do polímero e neste último caso a descrição das ramificações.

Em termos gerais, nos polissacarídeos, pode-se encontrar quatro tipos principais de estruturas.

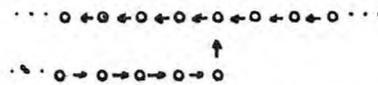
Uma cadeia linear



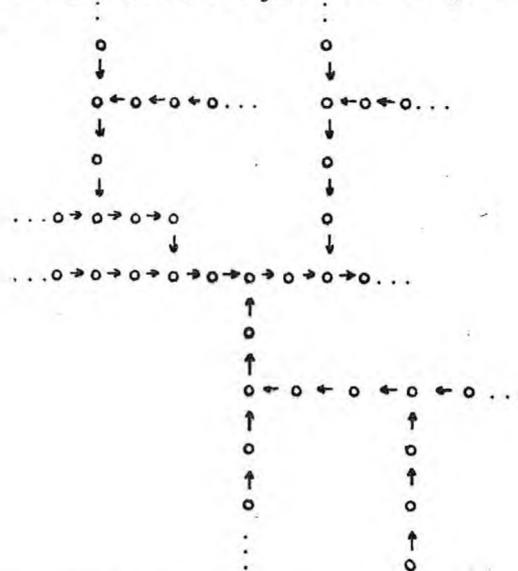
Uma cadeia linear com múltiplas cadeias laterais.



Uma cadeia linear com uma só ramificação



Uma estrutura com ramificações múltiplas



Em seguida são mencionados alguns dos mais importantes métodos de investigação estrutural de polissacarídeos.

Metilação exaustiva e hidrólise, método empregado por HAWORTH, (32) informa sobre os grupos funcionais que intervêm nas uniões interglicosídicas. Consiste em submeter o polissacarídeo a ação de reativos metilantes ( $\text{SO}_4(\text{CH}_3)_2$ ),  $\text{ICH}_3$  etc... que transformam todos os grupos  $-\text{OH}$  livres em grupos metoxila  $-\text{OCH}_3$ . A hidrólise posterior deste derivado indicará então que grupos  $-\text{OH}$  estavam implicados na união que existia nos polímeros. Os vários açúcares metilados podem ainda serem separados e identificados por cromatografia gasosa após conversão destes em derivados mais voláteis. (23,24)

O método descrito acima pode dar informações acerca dos tipos de uniões interglicosídicas e o seu grau de ramificação, mas não sobre a disposição precisa dos resíduos dos polímeros. Se existe mais de um tipo de unidade estrutural ou se trata de decidir entre diferentes classes de ramificações será necessário recorrer a outros métodos.

Oxidação com periodato e fragmentação enzimática são comumente usados. (25)

Algumas técnicas fisicoquímicas são geralmente aplicados na investigação dessas moléculas. Estudos de  $^{13}\text{C}$  NMR e  $^1\text{H}$  NMR são muitos utilizados para informações sobre estruturas e configuração de polissacarídeos. (26-30)

Espectros no infravermelho também facilitam a determinação do tipo de configuração. Espectros de  $\alpha$  poliglicoses geralmente mostram uma banda de absorção em  $\approx 840\text{cm}^{-1}$  enquanto que para as  $\beta$  poliglicoses, a banda se desloca para  $\approx 890\text{cm}^{-1}$ .

## 2.2. COMPLEXOS METÁLICOS COM CARBOIDRATOS

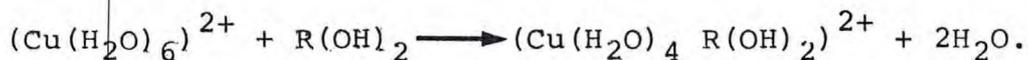
### 2.2.1. Metais-simples carboidratos

A fim de facilitar o estudo e interpretação das interações de íons metálicos com polissacarídeos iniciaremos com considerações a respeito da interação destes íons com simples carboidratos, o que certamente facilitará o entendimento das macromoléculas.

Os termos adutos e compostos de adição são sinônimos e são usados para descrever aqueles complexos constituídos da ligação entre um carboidrato e um sal metálico (ou base). Esta ligação é feita provavelmente por forças de atração íon-dipolo.

Em alguns casos onde o proton hidroxílico é removido do carboidrato o termo alcoolato é mais indicado. (31)

Em soluções aquosas, de um modo geral os íons metálicos formam um íon aquoso, ou um aqua complexo. O processo da formação de um complexo em solução aquosa é essencialmente o deslocamento de alguns dos seus ligantes, ou seja, de moléculas de água por outros grupos. Isso pode ser exemplificado pela reação do aqua complexo de cobre com um diol. (32)



Em soluções aquosas diluídas, o grau na qual cátions metálicos interagem com açúcares neutros, pode virtualmente não existir, não fosse a quelação um fator que contribuisse para a estabilidade do complexo. Alcoois monohidroxilados são essencialmente incapazes de deslocar água de hidratação ao redor do íon

metálico em solução. No entanto ligantes que contenham duas ou mais hidroxilas em arranjo estérico favorável podem deslocar. (9)

ANGYAL<sup>(6,9)</sup> em seus estudos complexos metálicos com açúcares neutros, estabelecem que em solventes hidroxílicos uma variedade de cátions-metálicos formam complexos de 1:1 com ciclitóis e açúcares que contém uma sequência de 3 grupos hidroxílicos, axial-equatorial-axial, para um anel de 6 membros, ou uma sequência cis-cis para um anel de 5 membros. Um exemplo típico é a formação do complexo  $\alpha$ -D-alopiranosose- $\text{Ca}^{2+}$  e  $\alpha$ -D-alofuranose- $\text{Ca}^{2+}$ .

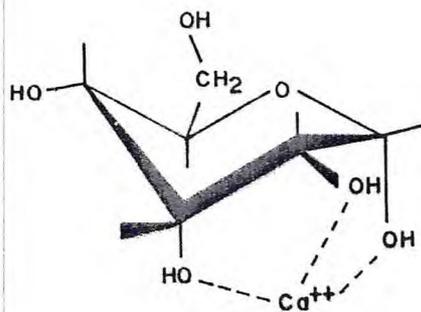
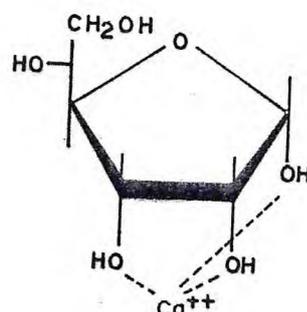


Figura 21 -  $\alpha$ -D-alopiranosose- $\text{Ca}^{2+}$  complexo



$\alpha$ -D-alofuranose- $\text{Ca}^{2+}$  complexo

A formação de complexos com alditóis (polihidróxidos não cíclicos) também foi investigada por ANGYAL e col.<sup>(5)</sup> e neste caso a complexação ocorre preferencialmente nos 3 átomos de oxigênio que tem arranjo tipo "gauche-gauche". A possibilidade de complexação foi discutida para cada alditol individualmente de acordo com a sua conformação. Como exemplo temos o manitol complexionado com  $\text{Eu(III)}$ .

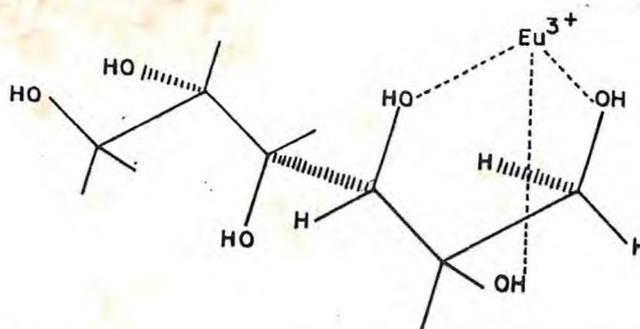
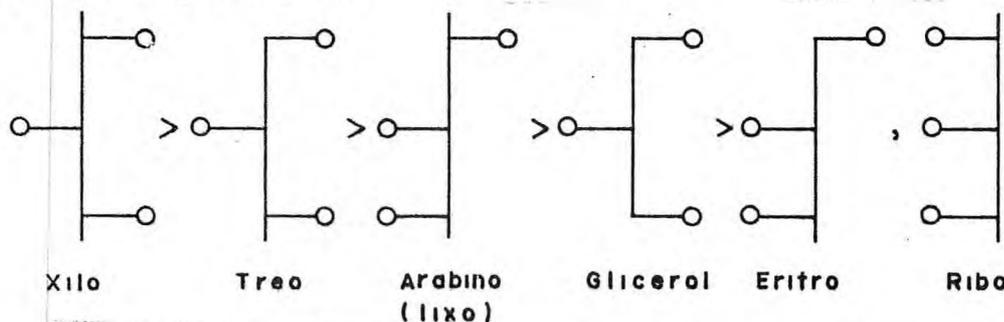


Figura 22 - Complexo Eu(III)-D-manitol

GRASDLIN e col. <sup>(33)</sup> realizaram estudos com  $\alpha$  metilgulo-  
piranose em soluções aquosas de sais de lantanídeos e estabele-  
ceram que Eu(III) e Pr(III) formam complexo de 1:1 com o glico-  
sídeo e estão ligados próximo a sequência de oxigênios axial  
equatorial axial no C-1, C-2 e C-3.

KIEBOOM e col. <sup>(34)</sup> também realizaram estudos da comple-  
xação de alditois e a seguinte sequência de ligantes tridenta-  
dos  $(H-C-OH)_3$  com respeito a complexação com Pr(III) foi estabe-  
lecida em solução aquosa.



O sítio da especificidade de complexação de vários aldi-  
tois mostra que a força da formação do complexo é marcadamente  
dependente da configuração do ligante. Comparação dos vários  
possíveis ligantes tridentados, em cada alditol, com o modo de  
complexação, revela:

sorbitol: xilo > treo, eritro, arabino (lixo)

iditol: xilo > treo

manitol: arabino (lixo) eritro

galactitol: treo > arabino (lixo), eritro

xilitol: xilo > treo

(a nomenclatura <sup>(35)</sup> denota a configuração no átomo de carbono secundário do ligante tridentado).

Dos exemplos citados acima, quer sejam polihidroxilados cíclicos ou não, fica evidente que a quelação e portanto a formação dos complexos depende de um arranjo estérico favorável.

Muitos complexos de açúcares e derivados de açúcares com sais inorgânicos tem sido isolados na forma sólida e frequentemente na forma cristalina. Estes compostos tem estereoquímica definida, mas isso não prova a existência destes em solução. Muitos métodos físicos, tais como solubilidade, rotação ótica, viscosidade, eletroforese, <sup>(36)</sup> RMN e fluorescência entre outros, tem sido úteis para provar a existência destes complexos açúcares-metais em solução. <sup>(4)</sup> Dos métodos citados, provavelmente a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foi o mais utilizado.

A investigação de estruturas e constantes de estabilidade para vários complexos de açúcares, entre os quais alguns já mencionados, tem sido estudados por ANGYAL <sup>(6,3)</sup> utilizando <sup>1</sup>H RMN.

De acordo com os resultados obtidos do estudo de ciclos com vários íons metálicos foi observado que a formação do complexo causa um deslocamento para campos mais baixos nos sinais no espectro de  $^1\text{H}$  NMR, sendo que o átomo de hidrogênio vicinal do átomo de oxigênio central na sequência axial-equatorial-axial é o que causa maior deslocamento.

A Tabela 4 mostra o efeito de vários sais em solução de D-alose em  $\text{D}_2\text{O}$ . A composição, constante de estabilidade e deslocamento do sinal anomérico da  $\alpha$ -D-alopiranosose são mencionados.

Tabela 4 - Efeito de sais na solução de D-alose em  $\text{D}_2\text{O}$ . Composição, constante de estabilidade do complexo e  $\Delta\text{ppm}$  do sinal anomérico da alopiranosose.

Sal	M	$\alpha\text{F}(\%)$	$\beta\text{F}(\%)$	$\alpha\text{P}(\%)$	$\beta\text{P}(\%)$	$K_{-1}$ mol l	$\Delta\delta$ ppm
		3,5	5,0	14,0	77,5		
NaCl	1,6	3,0	4,4	16,1	76,5	0,12	0,02
MgCl <sub>2</sub>	1,1	3	5	16,5	75,5	0,19	0,02
CaCl <sub>2</sub>	0,7	6,7	44,2		49,1	6,2	0,10
Y(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,7	4,2	30,8		65	1,9	0,14
LaCl <sub>3</sub>	0,9	10,4	2,6	49,4	37,6	10,4	0,22

Tudo indica que o raio ótimo para formação do complexo com a sequência ax-eq-ax de grupos hidrofílicos e aproximadamente  $1,0\text{\AA}$  ( $\text{Na}^+$   $0,97$ ,  $\text{Ca}^{2+}$   $0,99$  e  $\text{La}^{+3}$   $1,02\text{\AA}$ ).

Os experimentos de GRASDLEN e col. <sup>(33)</sup>, KIEBOOM e col. <sup>(34)</sup>

os quais já foram feitas referências também foram realizados utilizando  $^1\text{H}$  NMR.

A formação de complexos entre açúcares e cátions em solução tem sido estudados por uma variedade de outros métodos.. Resultados de experimentos de diálise<sup>(37)</sup> mostraram que  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  formam quelatos em soluções alcalinas com D-galactose, D-glicose, D-frutose, D-ribose e lactose.

A rotação ótica de muitos açúcares e derivados geralmente é alterada pela presença de sais metálicos. Este fenômeno pode ser atribuído a formação de complexos e por isso alguns autores tem realizados estudos utilizando essa técnica.<sup>(38)</sup> Entre estes LUGOVAYA e col,<sup>(39)</sup> que observaram a formação de complexos de dextrana.

Outro fenômeno físico que pode estar associado no mínimo parcialmente com a formação do complexo é o efeito de um sal na viscosidade de soluções aquosas de açúcares.<sup>(1)</sup>

Experimentos eletroforéticos também tem dado a sua contribuição no sentido de permitir informações qualitativas sobre a habilidade de complexação relativa de vários íons metálicos, principalmente íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos.<sup>(1,36)</sup>

Algumas informações com respeito a estrutura e estabilidade destes complexos são conhecidas através de cromatografia de camada fina.<sup>(32)</sup>

Logo a seguir estão os resultados obtidos da complexação de vários íons metálicos com alguns compostos polihidroxilados.

TABELA 5 - Valores de  $R_f$  para a D-glicose, D-glucitol e D-manitol em camada fina na forma de vários íons metálicos, coeficiente de complexação (k) e percentagem dos compostos polihidroxilados complexionados. (32)

Íon metálico	D-glicose		Percentagem complexionada	D-glucitol		Percentagem complexionada	D-manitol		Percentagem complexionada.
	$R_f$	k		$R_f$	k		$R_f$	k	
Na <sup>+</sup>	0,88	0,05	4,8	0,83	0,12	10,7	0,82	0,13	11,5
Mg <sup>+2</sup>	0,93	0	0	0,91	0,2	2,0	0,91	0,02	2,0
Al <sup>3+</sup>	0,84	0,10	9,1	0,79	0,17	14,5	0,81	0,14	12,3
Ca <sup>2+</sup>	0,92	0,01	1,0	0,66	0,40	28,6	0,77	0,20	16,7
Cr <sup>3+</sup>	0,82	0,13	11,5	0,81	0,14	12,3	0,71	0,30	23,1
Fe <sup>3+</sup>	0,85	0,09	8,3	0,71	0,30	23,1	0,81	0,14	12,3
Ni <sup>2+</sup>	0,88	0,05	4,8	0,81	0,14	12,3	0,82	0,13	11,5
Cu <sup>2+</sup>	0,80	0,16	13,8	0,02	45,30	97,8	0,18	4,14	80,5
Zn <sup>2+</sup>	0,92	0,01	1,0	0,88	0,05	4,8	0,89	0,04	3,8
Sr <sup>2+</sup>	0,93	0	0	0,69	0,34	25,4	0,80	0,16	13,8
Cd <sup>2+</sup>	0,92	0,01	1,0	0,88	0,05	4,8	0,90	0,03	2,9
Ba <sup>2+</sup>	0,87	0,06	5,7	0,72	0,29	22,5	0,80	0,16	13,8

$$k = \left[ \text{poliol complexionado} \right] / \left[ \text{poliol não complexionado} \right]$$

Os cátions univalentes de metais alcalinos formam fracos quelatos em soluções aquosas. Com compostos polihidroxilados neutros, somente um arranjo especial de 3 grupos hidroxilas, permitindo a quelação, torna a ligação possível. (9)

Em meio alcoólico a complexação de metais alcalinos com compostos polihidroxilados é mais forte, aparentemente devido as moléculas de álcool na esfera de solvatação primária do cátion estarem mais fracamente ligadas que a água.

Presumidamente 3 moléculas de solvente devem ser deslocadas de um metal alcalino enquanto um quelato tridentado está sendo formado.

Estudos eletroforéticos indicam que a ordem de reatividade de de complexos de metais alcalinos e alcalinos terrosos com compostos polihidroxilados neutros em solução aquosa é:  $(Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) > Mg^{2+} > Na^+ > K^+ > Li^+$ . A posição do  $Li^+$  é atribuída a força com que o íon está ligado a sua esfera de solvatação.

O grau de solvatação dos metais alcalinos em solução diminui com o aumento do peso atômico,  $Li^+ > Na^+ > K^+$ . No entanto a aparente habilidade do  $Na^+$  relativa ao  $K^+$  para complexionar com carboidrato requer uma explicação diferente. Neste caso o menor raio iônico do  $Na^+$  é um fator mais importante do que a esfera de solvatação.

Em geral a força de uma ligação entre uma molécula doadora e um íon metálico é maior quanto menor o raio e maior a carga do íon. A aparente maior estabilidade dos metais alcalinos terro

so é provavelmente devido a dupla carga destes íons, o  $Mg^{+2}$  difere apreciavelmente dos outros metais alcalinos no comportamento eletroforético, possivelmente pela mesma razão que o  $Li^+$ .

Os íons metálicos alcalinos e alcalinos terrosos tem sido mais estudados que todos os outros e um artigo bastante interessante e detalhado sobre a complexação destes íons com carboidratos foi publicado por RENDLEMAN. (31)

De maneira geral cátions polivalentes interagem mais fortemente que cátions univalentes. Alguns íons apresentam campo coulombiano tão fortes que efetivamente removem o próton hidroxílico dos ligantes polihidroxilados. Para uma molécula em particular, como por exemplo o ácido D-glucônico, as constantes de estabilidade de complexos de metais de transição geralmente são maiores que para aqueles de metais alcalinos e metais alcalinos terrosos. (32)

Quando um determinado ligante multidentado interage com uma série de íons metálicos no mesmo estado de oxidação, a ordem de diminuição na estabilidade do quelato, nem sempre depende da natureza da molécula ligante. (9)

Para cátions divalentes MELLOR e MALEY (40) encontraram a seguinte ordem de reatividade:  $Pb > Cu > Ni > Co > Zn > Cd > Fe > Mn > Mg$ .

Para a primeira série de metais de transição IRVING e WILLIAM (41) mostraram que existe uma relação entre estabilidade do quelato e número atômico.

Zn<Cu>Ni>Co>Fe>Mn.

A influência do raio na estabilidade de complexos com poliois foi revelada por estudos de interação de íons lantanídeos com 1,2 etanodiol; 1,2 dihidroxipropanos e glicerol. <sup>(42)</sup> As constantes de estabilidade para estes complexos aumentam com o número atômico do La(III) para o Lu(III). Em outras palavras, íons de raios menores e portanto, campo coulombiano mais fortes favorecem mais fortes coordenações.

### 2.2.2. Metais - polissacarídeos complexos

Até o momento temos discutido o comportamento da complexação de íons metálicos dando ênfase a pequenos ligantes contendo poucos grupos doadores. Nesta etapa discutiremos o comportamento dos ligantes macromoleculares.

Devido ao grande número de sítios de ligação nestas macromoléculas, evidentemente a química envolvida na complexação de polissacarídeos é entendida com mais dificuldade do que aquela para simples carboidratos.

Muitos fatores, incluindo densidade de carga linear, que ligação, ligação intermolecular de dois ou mais grupos doadores e favorável efeito estérico contribuem para a formação e estabilidade de complexos metais-polissacarídeos. <sup>(9)</sup>

RENDLEMAN <sup>(15)</sup> divide os complexos polissacarídeos em duas categorias. Os polissacarídeos neutros como celulose e amido e os polissacarídeos aniônicos tais como alginato, pectato ,

mucopolissacarídeos e carragenana.

Os polissacarídeos neutros formam fracos complexos com cátions em meio neutro ou não alcalino, principalmente quando se trata de cátions com pouca habilidade para polarizar um átomo doador tais como metais alcalinos e metais alcalinos terrosos. Apenas em soluções alcalinas existe alguma afinidade entre cátion e grupos doadores.

Por outro lado polissacarídeos aniônicos tem uma forte afinidade por contra íons mesmo a baixas concentrações,

De maneira geral há poucas informações na área de complexação entre cátions e polissacarídeos neutros em meio aquoso ou não alcalino. A pouca atenção tem sido focalizada no amido e em menor grau, na celulose.

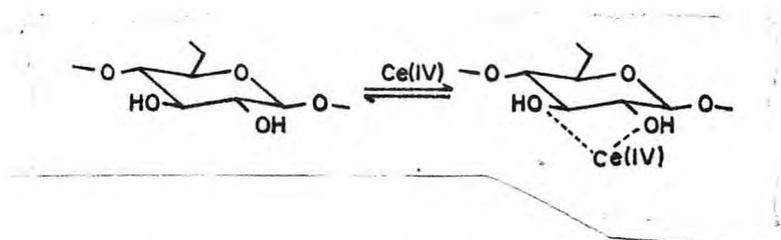
SENTI e WITNAUER, <sup>(43)</sup> no entanto isolaram alguns complexos de amilose usando sais de metais alcalinos e alcalinos terrosos, sendo o mais estudado deles o complexo de amilose-KBr. Isolamento deste complexo necessita de adição de etanol que não somente insolubiliza o aduto, como estabiliza a ligação entre o cátion e o carboidrato. Adutos na proporção de 2:1 ou 1:1 são geralmente formados e o exame de raio X indica que a cadeia de amilose é uma hélice enrolada para a esquerda com quatro unidades de D-glicose por turno.

O baixo grau de interação sal-carboidrato em água é ilustrada pela virtual inabilidade de "locust-bean gum" afetar a condutividade de numerosos íons ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Ag^+$ ,  $Cl^-$ ,

etc... (44)

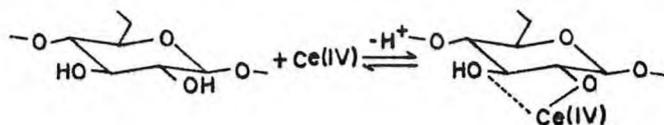
A celulose do algodão forma complexo com cobre, prata e ouro. Dentre estes a interação do cobre tem sido investigada mais intensivamente. Adições de amostra de celulose a soluções de sais de cobre diluídos faz o pH cair, um efeito que sugere que a complexação é acompanhada pelo despreendimento do proton hidroxílico para formar ligações metal-oxigênio. (15)

O íon cério(IV) pode reagir com polissacarídeos em solução ácida ( $\text{LMH}^+$ ) para produzir complexos que apresentam um estado intermediário conforme o Esquema I abaixo.



Esquema 1 - Reação do Ce (IV) com celulose

Outra possibilidade (Esquema II) é que cério (IV) reage inicialmente para formar um alcoóxico. Esse esquema está de acordo com o fato de que o grau de complexação diminui com o aumento da concentração ácida.



Esquema 2 - Reação de Ce (IV) com celulose formando um alcoóxico

No estado iônico, Ce(IV), tanto quanto Fe(III) e Co(III) são altamente instáveis devido a magnitude de suas cargas. Essa instabilidade pode ser reduzida por formação de ligações coordenadas com oxigênios dos grupos hidroxílicos, os quais promovem a remoção dos protons hidroxílicos.

O deslocamento dos protons hidroxílicos nos carboidratos neutros contribui grandemente para a estabilidade do complexo. Diferente de muitos cátions metálicos altamente carregados tais como alguns metais de transição e certos lantanídeos, em meio neutro, os metais alcalinos, metais alcalinos terrosos e íons lantanídeos trivalentes são incapazes de efetuar este deslocamento. Na presença de base no entanto, compostos polihidroxilados sofrem ionização, o que facilita a formação de metais-alcoolatos complexos. (15)

A reação entre celulose e Cu(II) em meio fortemente básico é rápida e reversível. REEVES (45) tem discutido bastante a interação de Cu(II) em soluções de hidróxido de amônio com poliois para formar cupramônio complexos. Ele sugere que a complexação ocorre mais prontamente com grupos hidroxílicos vicinais que são cis com respeito ao outro (ou seja, o ângulo diedral formado pelas ligações C-O é igual a 0). Complexação também ocorre onde o ângulo diedral é igual a 60°, mas deve ser mais fraca do que para cis diol. Não deve existir complexação onde os ângulos são 120° ou 180°. Os ângulos diedrais formados pelas hidroxilas do C-2 e C-3 nos resíduos da celulose são 60°.

A celulose natural tem uma conformação de dupla hélice . Sob ação de hidróxido de sódio, ela produz uma série de mudanças que leva a formação de um material cristalino chamado celulose de sódio II. A estequiometria destes complexos é variável . Os adutos, ou quem sabe misturas de adutos e alcoolatos, são formados de acordo com a concentração do alcali; (1:1, 2:1, 3:1, 3:2 e 4:3).<sup>(15)</sup>

Um outro composto de celulose, denominado celulose de sódio-cobre<sup>(15)</sup> é preparado por imersão do algodão em solução concentrada de NaOH contendo hidróxido cúprico dissolvido. A estrutura do composto é desconhecida, no entanto análises tem revelado que a relação de resíduo de D-glicose para cobre é de aproximadamente 2:1 sobre uma grande variação de concentração do alcali (5-10N NaOH). Neste caso a espécie reativa é provavelmente o íon  $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$ .

SENTI e WITNAUER<sup>(43)</sup> trataram amilose tanto com LiOH , KOH e  $\text{C}_5\text{OH}$  em 25% de etanol-água para obter produtos numa relação 1:3 (1 de hidróxido para 3 de resíduo de D-glicose). A estereoquímica é variável conforme a concentração do hidróxido .

Para explicar a sequência de íons metálicos dos alcoolatos de amido, onde a estabilidade dos complexos para os metais alcalinos é  $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$  devemos lembrar um fator que é a que-  
 lação interna. Essa é a mesma ordem teoricamente esperada, de aumento na qual as moléculas de água podem ser deslocadas da esfera de coordenação primária do cátion.

Alcoolatos de metais alcalinos terrosos de polissacariídeos neutros tem sido pouco estudados.

CLUSKEY<sup>(46)</sup> investigou a reação de hidróxido de bário com dextrana e encontrou que um aumento nas quantidades de hidróxido de bário à solução do polissacarídeo, diminuía a viscosidade da solução seguida por precipitação de um complexo bário-dextrana. CLUSKEY<sup>(46)</sup> propôs que a mudança na viscosidade e posterior precipitação, resultavam das pontes intermoleculares e intramoleculares formadas por moléculas de  $Ba(OH)_2$ . As pontes devem ocorrer pela coordenação da  $Ba^{2+}$  a 2 oxigênios aniônicos (dois grupos hidroxilas ionizados) localizados na mesma cadeia, tanto quanto em cadeias separadas.

Um procedimento usual para preparação de adutos de carboidratos, não maiores que oligossacarídeos, é evaporar lentamente uma solução contendo carboidrato e sal na relação molar aproximadamente esperada. O tempo requerido para cristalização depende de vários fatores tais como, temperatura, velocidade de evaporação, agitação, solubilidade do aduto etc... e pode variar de 1 dia até muitos dias.<sup>(31)</sup>

Na preparação de adutos de polissacarídeos existe pouca informação. Como foi mencionado anteriormente SENTI e WITNAUER,<sup>(43)</sup> prepararam seus compostos em meio alcalino com um sal apropriado em (20-25%) de mistura água-etanol.

Inabilidade para isolar um aduto em particular, não prova que este aduto não existe. Estabilidade, facilidade de cristata

lização ou de precipitação de um aduto pode variar largamente de acordo com as condições de preparação. (31)

Ao contrário dos polissacarídeos neutros, os polieletrólitos (ou polissacarídeos aniônicos) tem uma grande afinidade por contra íons e por conseguinte a literatura registra um número bem maior de complexos. (15)

A maioria desses polieletrólitos contém grupos carboxilatos, fosfatos ou sulfatos.

Dentre os polissacarídeos contendo grupos carboxilatos talvez os mais estudados sejam as substâncias pecticas e o ácido algínico pela sua importância industrial (na indústria de alimentos e como agente emulsificante e estabilizante respectivamente) e por que um melhor entendimento desses polieletrólitos significa um melhor entendimento das funções biológicas de muitos outros polissacarídeos contendo carboxilatos.

A interação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  com as substâncias pecticas tem sido bastante explorada, no entanto a função do íon  $\text{Ca}^{+2}$  no processo de gelificação dessas substâncias ainda não é bem conhecida.

A interação de íons metálicos com alginatos parece ter comportamento no qual o polianion se comporta como agente quelante. Os dois grupos vicinais de hidroxilas no C-2 e C-3 tem maior afinidade por cátions. No estudo da interação de ácido algínico muitos foram os metais utilizados (ex:  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  entre outros).

Como polissacarídeos contendo grupos fosfatos poucos estudos tem sido realizados para determinar afinidades por cátiões e seletividade. No entanto, a afinidade do  $\text{Ca}^{2+}$  por grupos fosfatos do amido da batata tem mostrado ser maior que para o íon  $\text{Mg}^{2+}$ .

Finalmente os grupos de polissacarídeos contendo sulfato. Entre eles estão os mucopolissacarídeos ácidos, o sulfato de Dextrana e a carragenana. Para esses compostos a fixação de cátiões fracamente acídicos parece lembrar a formação de complexos de esfera externa na qual o cátion é separado do grupo aniônico por uma molécula de solvente.

Consideramos conveniente citar a respeito de polissacarídeos aniônicos, mas de maneira breve. Para maiores informações a leitura do artigo publicado por RENDLEMAN<sup>(15)</sup> é muito útil.

### 3. DEXTRANA

#### 3.1. PROPRIEDADES GERAIS

Dextranas são polissacarídeos constituídos de monômeros de  $\alpha$ -D-glicopiranosose unidas principalmente através de ligações  $\alpha$ -1-6, tendo algumas vezes ramificações que formam ligações  $\alpha$ -1-3 e  $\alpha$ -1-4. (10)

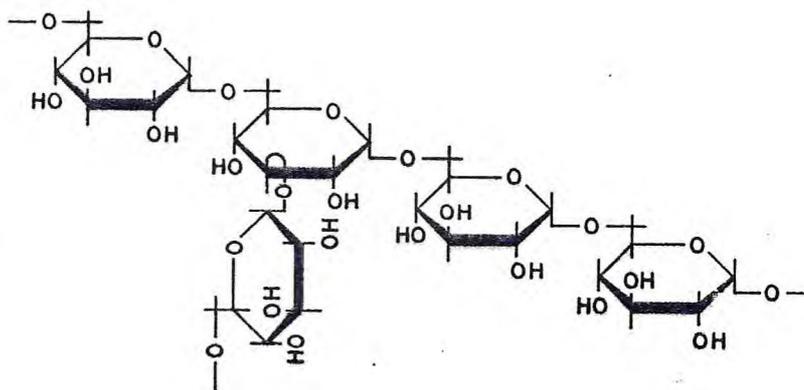


Figura 23 - Estrutura da dextrana com ramificação  $\alpha$ 1-3.

A maioria das dextranas conhecidas são sintetizadas por ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* na sacarose, ou por outras bactérias pertencentes a família *Lactobacillaceae*, tais como *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

O meio de cultura exerce uma grande influência na estrutura das dextranas. Tanto suas estruturas como suas propriedades são determinadas primariamente pela cepa que as produz. (11)

Dextranas nativas, isoladas do meio de cultura que as produzem, são extremamente polidispersas e contêm moléculas de todos os tamanhos, desde oligômeros até dextranas de peso molecular de centenas de milhões. Esta variação de peso molecular pode ser reduzida por hidrólise ácida parcial, para produzir dextranas de peso molecular bem definido.

Existem muitos métodos de degradação que são aplicados, embora a hidrólise ácida<sup>(47,48)</sup> seja o método mais geral. São estes, degradação por hidrólise alcalina,<sup>(49)</sup> por peróxido de hidrogênio, por enzimas, por ultra som, por tratamento de calor, etc....<sup>(50)</sup>

Dextranas de uso clínico são em geral preparadas por hidrólise ácida. Foi observado que durante a hidrólise ácida as ramificações  $\alpha$ -1-4 e  $\alpha$ -1-3 são mais sensíveis que as ligações  $\alpha$ -1-6 da cadeia principal. O que é uma vantagem para o uso farmacêutico, pois facilita a linearidade da cadeia.

Estudos de metilação<sup>(51)</sup> e oxidação com periodato<sup>(52)</sup> mostraram que aproximadamente 95% das unidades de glicose de dextranas nativas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 estão unidas através de ligações adjacentes  $\alpha$ -1-6, as outras 5% restantes estão presentes como ramificações. Portanto ramificações trifuncionais podem ocorrer em média para cada 20 resíduos de glicose.<sup>(52)</sup>

A caracterização de uma determinada fração de dextrana deve ser específica e rigorosa desde que a variedade nas pro

priedades do polímero, mesmo quando obtido pelo mesmo tipo de microorganismo, é muito grande. O tamanho, a forma, a distribuição de peso molecular e ramificação portanto, não podem ser generalizados.

As frações de dextranas obtidas pela degradação em meio ácido de dextrana NRRL B512 foram caracterizadas por viscosidade intrínseca, constante de sedimentação e espalhamento de luz. (52)

Os resultados das medidas de viscosidade intrínseca são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Viscosidade intrínseca para frações de dextrana NRRL B512. (52)

Fração	$M_w \times 10^{-3}$	$M_n \times 10^{-3}$	$(\eta)$	Fração	$M_w \times 10^{-3}$	$M_n \times 10^{-3}$	$(\eta)$
1	17,7	14,5	0,129	13	254	-	0,417
2	18,4	16,7	0,133	14	445	-	0,450
3	31,4	29,4	0,182	15	422	-	0,458
4	37,7	25,4	0,197	16	603	-	0,522
5	49,9	47,2	0,214	17	746	-	0,610
6	62,8	51,6	0,237	18	975	-	0,633
7	65,6	57,6	0,252	19	1040	-	0,619
8	78,8	67,5	0,280	20	2700	-	0,800
9	92,6	71,3	0,284	21	4900	-	0,785
10	109	90,6	0,332	22	6940	-	0,850
11	153	-	0,332	23	8200	-	0,935
12	185	-	0,378	24	9500	-	0,935

$M_w$  = peso molecular

$M_n$  = peso molecular médio, determinado por medidas do poder de redução

$(\eta)$  = viscosidade intrínseca. (ml/g)

De acordo com os valores dessas medidas de viscosidade e análises com periodato, os autores<sup>(52)</sup> concluíram que a dextrana B-512 consiste de uma cadeia linear com ramificações uniformemente distribuídas ao longo da cadeia.

BASEDOW e EBERT<sup>(53)</sup> estudaram as propriedades de várias soluções de dextrana de peso molecular conhecido e caracterizaram através de medidas de viscosidade e medidas calorimétricas em vários solventes. Os resultados indicam que dextranas de pesos moleculares maiores que 2.000 estão perfeitamente "enroladas" na solução e que as interações entre as moléculas na solução são pequenas. Até peso molecular aproximadamente 2.000 as moléculas de dextrana apresentam-se em forma de bastão.

Em soluções de sais diluídos as cadeias da dextrana são mais expandidas do que em água, o que pode ser concluído pelo aumento na viscosidade intrínseca como podemos observar na tabela 7.

Tabela 7 - Viscosidade intrínseca de soluções de dextrana com outros componentes

Solução aquosa	Viscosidade intrínseca (ml/g)
Água	27,1
10% Glicose	27,2
10% NaCl	27,6
10% Uréia	27,9
10% MgSO <sub>4</sub>	28,1
20% Metanol	22,1

O aumento na viscosidade intrínseca com a presença de um

terceiro componente, indica a expansão das cadeias na solução. No caso do metanol, que é um agente precipitante, causa a diminuição da viscosidade intrínseca das cadeias da dextranas.

Esses valores estão de acordo com os dados de ANTONINI e col. (54) que mostraram que o raio do giro (obtido por medidas de espalhamento) sofria um significativo aumento em solução de sais, uréia e glicose.

O processo de dissolução de dextrana, em todos os solventes conhecidos, é altamente exotérmico, e pode ser explicado pela formação de fortes ligações de hidrogênio entre o solvente e a dextrana. Os calores de solução de dextrana em alguns solventes são dados na Tabela 8. Os mais altos calores correspondem aos melhores solventes. Os calores de solução da dextrana são praticamente independentes para dextranas de pesos moleculares maiores que 2.000 mas diminui fortemente para oligômeros.

Tabela 8 - Calores de solução de dextrana ( $\bar{M}_w = 101.000$ )

Solvente	Calor de solução (J/g)
Glicol	-98
Água	-150
DMSO	-187
Formanida	-228

Soluções de dextrana são fortemente dextrorrotatórias.  $[\alpha]_d^{25} = +200^\circ$ . Para dextranas obtidas da cepa NRRL 512 a  $[\alpha]_d^{25}$  é

dependente do número de ligações  $\alpha(1-3)$ .<sup>(55)</sup>

Estudos de dispersão ótica rotatória (ORD) realizados por HENRYK<sup>(56)</sup> indicam que soluções de dextrana em mistura etanol-H<sub>2</sub>O ou em H<sub>2</sub>O tem O.R.D. positiva. Na faixa de comprimento de onda de 300-700nm a dextrana apresenta uma curva normal.

Algumas propriedades são comuns a todas as dextranas, por exemplo, todas as dextranas são brancas e sólidos cristalinos (quando purificados). Outras propriedades podem diferir de acordo com o tipo de cepa utilizada para sua obtenção.

Em geral dextranas que tem alto teor de ligações  $\alpha 1,6$  são prontamente solúveis em água, enquanto que outras, inexplícavelmente, apresentam alguma dificuldade de se dissolverem.

### 3.2. OBTENÇÃO<sup>(11)</sup>

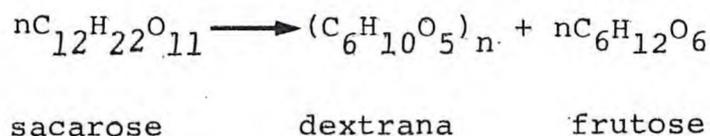
Dextrana se desenvolve naturalmente em soluções contendo sacarose que tenha sido inoculada com bactéria produtora de dextrana, proveniente do ar, plantas ou solos. Outros polissacarídeos também resultam da ação microbiana em sucos açucarados, mas a dextrana parece ser a mais obtida por este processo de fermentação.

O desenvolvimento de dextranas ocorre rapidamente na cana de açúcar, no mel e nos xaropes quer sejam puros ou contaminados. Até em amostras de sacarose cristalina refinada alguns testes já indicaram presença da dextrana.

Dextranas produzidas por *Leuconostoc* tem também sido isoladas de fontes tais como cerveja não pasteurizada, vinhos

caseiros, sucos concentrados de laranjas e muitos vegetais.

A reação para a produção de dextrana da sacarose, mostrada na equação (11)



O mecanismo envolve uma enzima que catalisa a transferência de uma glicose de uma molécula de sacarose, para uma crescente cadeia molecular de dextrana e liberação de aproximadamente 1 mol de frutose. (Figura 24).

Duas enzimas podem participar da síntese da dextrana. Uma é a enzima polimerizante denominada "dextrana sacarose" que é responsável pela síntese da cadeia linear. A outra é a enzima da ramificação que ataca as hidroxilas no C-2, C-3 ou C-4.

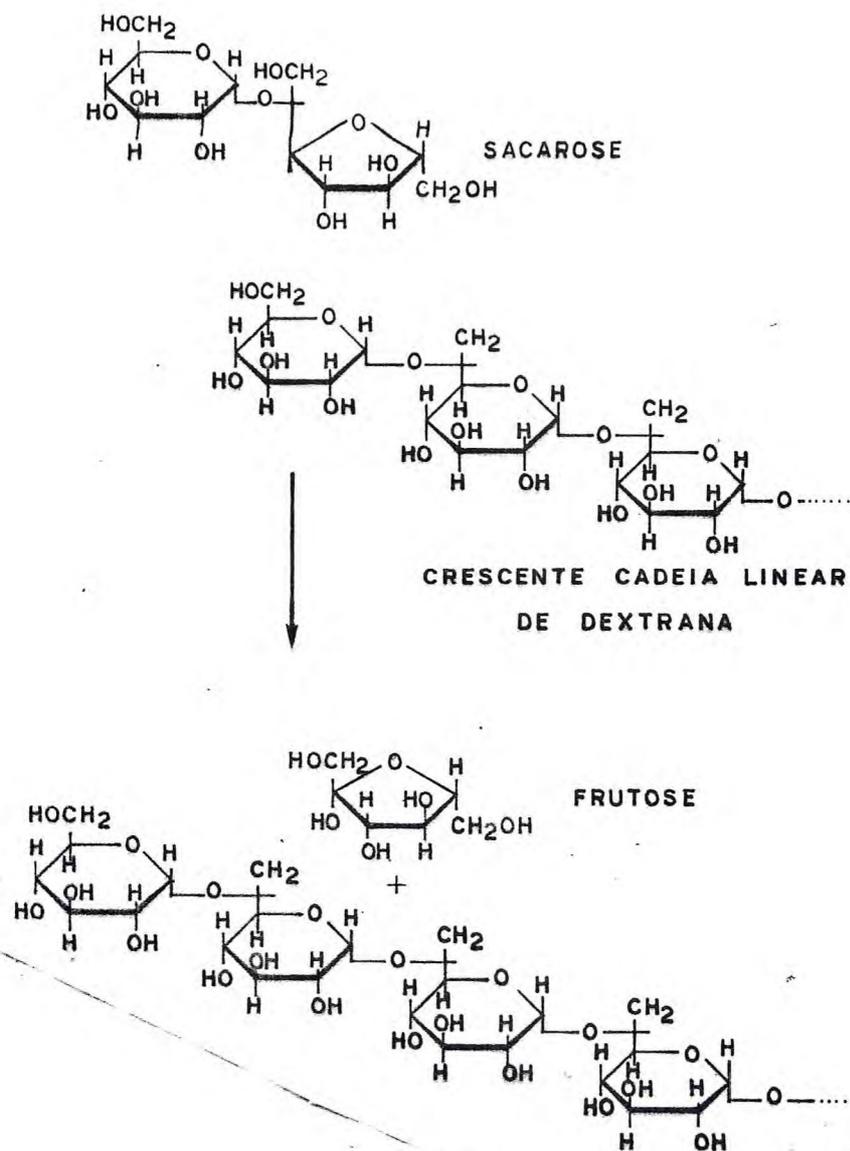


Figura 24 - Reação para a produção de dextrana.

A produção de dextrana em larga escala foi iniciada por volta de 1942-1944. No início, foram utilizados meios de crescimento diferentes em vários países. Por volta de 1952 entretanto, um tipo de cepa denominada NRRL B512F começou a ser produzida e até hoje é a mais intensivamente estudada.

O interesse pela produção da dextrana surgiu da necessidade de adequar suprimentos para uso terapêutico, principalmente porque ela pode atuar como expansor de plasma em eventuais necessidades.

### 3.3. REATIVIDADE DAS DEXTRANAS

A grande proporção de ligações  $\alpha(1-6)$  na dextrana fornece a cadeia excelente estabilidade a hidrólise ácida e alcalina. Os grupos redutores terminais são altamente reativos, no entanto são poucos nas dextranas de alto peso molecular. A reatividade da dextrana é portanto, grandemente determinada pelos grupos hidroxila, dos quais existem 3 por resíduo de glicose, excetuando nos pontos de ramificações e nos resíduos terminais desta.

Uma variedade de substituintes podem ser introduzidos via grupos hidroxilas e um grande número de derivados tem sido sintetizados, sendo em sua grande maioria patenteados.

Dentre estes derivados são conhecidos: ácidos alifáticos, ácidos dibásicos, aminoácidos, ácido nítrico, sulfúrico e fosfórico. O grande número de éteres que tem sido descritos incluem os alquilas, carboximetilas, cianometilas, arilas e aqueles de aldeídos bifuncionais e reagentes epóxidos. (57)

Dextranas formam complexos com muitos íons metálicos em solução sendo a maioria destes obtidos em meio alcalino. Na Tabela 9 estão relacionados alguns dos estudos da complexação de vários íons com a dextrana.

Tabela 9 - Complexos de dextrana com vários íons metálicos.

Íon metálico	Finalidade do estudo	Referência
Fe(III)	Obtenção do complexo Fe-dextrana para uso terapêutico	(12,58,59,60)
Cu(II)	Caracterização do complexo Cu-dextrana por métodos espectrofotométricos.	(61)
Cu(II)	Obtenção e estudo dos produtos da interação de dextrana de baixo peso molecular com íons cobre(II) em solução em função do pH do meio.	(62)
Cu(II)	Formação de um complexo cúprico estável.	(63)
Cu(II)	Caracterização do complexo por espectrofotometria U.V., equilíbrio de diálise e viscosidade.	(64)
Cu(II) Co(II) e Ni(II)	Formação de complexos com dextrana clínica, estudados através de espectrofotometria, equilíbrio de diálise.	(65)

Continuação da Tabela 9

Íon metálico	Finalidade do estudo	Referência
Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Mn(II)	Estudo da interação de dextrana com íons metálicos através de rotação ótica.	(39)
Zn(II), Mn(II) e Cu(II)	Efeito do peso molecular da dextrana e do pH na interação com os íons $Zn^{+2}$ , $Mn^{+2}$ , $Cu^{+2}$ .	(66)
Ce(IV), Mn(III) e V(V)	Efeito da estrutura de polissacarídeos com a sua oxidação por íons Ce(IV), Mn(III) e V(V).	(67)
Fe(III), Cr, Al(III)	Mecanismo de proteção contra intoxicação por vários íons metálicos, entre os quais os íons terras raras.	(14)
Sb	Preparação do complexo Sb-dextrana para uso terapêutico.	(13)
Ba (II)	Investigação da reação de hidróxido de bário com dextrana e estudos de viscosidade das suas soluções.	(15)

### 3.4. USOS

Baseados na sua grande habilidade para estabilizar xaropes, dextranas tem sido utilizadas na indústria de alimentos. Devido ao efeito estabilizador de suas soluções coloidais atuam contra a cristalização e tem alta especificidade para estabilizar a consistência de sorvetes.

Dextranas e seus derivados também tem tido significativas aplicações nas indústrias como, agricultura, cosméticos, resinas sintéticas, polarografia etc... além de serem muito úteis como adsorventes, floculantes, adesivos, nas separações de parafinas entre outros. (11)

Algumas propriedades biológicas da dextrana merecem especial atenção. Dextranas são inertes em muitos sistemas biológicos e portanto não afetam o comportamento da maioria dos tipos de células. O efeito estabilizador de suas soluções coloidais podem ser de boa utilidade no isolamento de partículas subcelulares. (55)

Estudos quantitativos de permeabilidade celular e passagem macromolecular através da barreira de vasos linfáticos são feitos usando dextranas marcadas com isotiocianato de fluoresceína. Comparações entre o volume das suspensões mitocondriais acessíveis a dextrana e a sacarose proporcionam informações acerca do volume do compartimento intermembranial da mitocôndria. Dextranas com semelhantes propriedades coloidais tem sido usadas para estimar o volume da parede celular bacteriana.

Dextranas tem muitas aplicações na área da medicina, a mais importante delas talvez seja sua utilização como substituto do plasma sanguíneo. Além disso podem ser usadas como estimuladores da circulação sanguínea no tratamento de trombozes e edemas cerebrais, como antiinflamatórios etc... (11).

Complexos metálicos de dextranas também tem sido bastante úteis na prática clínica, principalmente os compostos de ferro-dextrana que tem sido usados na prevenção de anemia. (58) Combinada com outros metais como o antimônio por exemplo, forma uma droga de grande valor para o tratamento da Leishmaniose (calazar) esquistossomose e no tratamento da arteriosclerose. (13)

Em estudos realizados por H. SELYE e col. (14) concluiu-se que quelatos de ferro, cromo, e alumínio-dextrana podem atuar contra o efeito letal ou de calcificação esplênica em ratos por intoxicação com vários metais como chumbo, escândio e cloretos de terras raras ( $TbCl_3$ ,  $SmCl_3$ ,  $YbCl_3$ ,  $PrCl_3$ ...)

Em trabalhos anteriores foi observado que tanto ferro, alumínio e Cr na forma de sais inorgânicos não eram tão bem tolerados como na forma de quelatos de dextrana.

O mecanismo de proteção não é bem elucidado, no entanto, desde que dextrana isoladamente não oferece proteção significativa contra a mortalidade ou calcificação esplênica, pode-se pensar que esse efeito profilático é devido a porção metálica competitiva dos quelatos.

Como foi dito anteriormente a atividade biológica e a aplicação industrial para a dextrana é grandemente dependente da distribuição de seu peso molecular.

Nesta etapa reproduziremos a Tabela apresentada por JEAN NES<sup>(11)</sup> que relaciona algumas de suas utilizações (entre as quais já foram citadas algumas) com a distribuição do seu peso molecular.

Tabela 10- Aplicações de frações de dextrana de peso molecular definido.

Peso molecular ou variação de peso molecular	Forma empregada (modo de uso)	Função
FARMACEUTICA		
75.000± 25.000	Solução de concentração 6% em 0.9% de sol. de NaCl; infusão intravenosa	"Dextrana clínica" padronizada para utilização como substi- tuto do sangue
75.000± 25.000	Solução de concentração 10-12% em água ou dextrose; infusão in- travenosa	Tratamento de hipoproteine- mia
40.000± 20.000	Solução de concentração 10% em 9% de solução de NaCl; infusão intravenosa	Reduz agregação de eritróci- tos, aumenta a fluidez do sangue; usado nos procedi- mentos clínicos e cirúrgicos
25.000 70.000, 200.000	Solução aquosa, o peso molecular é escolhido dependendo da locali- dade a ser examinada	Meio de suspensão para agen- tes de contraste destinados aos exames radiológicos de vasos sanguíneos, órgãos ou cavidades do corpo.

10.000-30.000	-	Estabilizador na liofilização de materiais tais como vacinas e bactérias.
7.000-10.00	Sulfato de sódio dextrana	Anticoagulante do sangue
2.000-10.000	Solução de complexo Fe-dextrana em 0.9% de cloreto de sódio, injeção intramuscular.	Tratamento das deficiências de ferro, anemias etc...

#### INDUSTRIAL

18.000, 74.000, 228.000, 7.400.000 100.000-3	Solução aquosa diluída	Meio superior de suspensão para polimerização de monômeros insaturados.
100.000-300.000	12% de dextrana e 0,5-3,0% de solução aquosa de sais de <u>cro</u> mo	Material preservador fotosensitivo para revestimento de placas usadas no processo de estampagem de tecidos.
> 10.000	5-50% por peso de sólido total em emulsões gelatinosa de hale <u>tos</u> de prata	Emulsões para filmes radiológicos e litográficos.

PESQUISAS QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

40.000,180.000  
500.000,2.2x10<sup>6</sup>

Dextrana, sulfato de sódio-dextra  
na dietil aminoetil-dextrana

Separações macromolecu  
lares em sistemas líqui  
dos de duas fases.

30.000-2x10<sup>6</sup>

Derivados de dietilaminoetil e  
carboximetil de géis de dextrana

Fracionamento de protei  
nas, ácidos nucleicos ,  
polissacarídeos..

250.000, 500.000

-

Separação e concentra  
ção de plaquetas do san  
gue. Preservação de leu  
cócitos.

7.000-8.000

Sulfato de dextrana em baixa re  
lação para proteínas

Estabilização seletiva  
de  $\gamma$  globulina e fibri  
nogenio no calor.

#### 4. FLUORESCÊNCIA DOS ÍONS TERRAS RARAS

A absorção e fluorescência dos íons terras raras, tem sido de grande interesse principalmente por seu uso como lasers. Além disso o interesse na fluorescência em solução é em parte devido a sua utilidade para explorar os mecanismos de transferência de energia.

Em geral, dois processos podem ser utilizados para se obter uma fluorescência mais intensa. O primeiro envolve a adição de um agente na solução (que usualmente é um composto orgânico) o qual absorve energia e a transfere para o íon terra rara que em seguida emite radiação característica de fluorescência.

Este fenômeno foi primeiramente observado por WEISSMAN<sup>(68)</sup> e depois extensivamente explorado por CROSBY e col.<sup>(69,70)</sup> O segundo processo envolve mudanças no envolvimento do próprio íon metálico.

##### 4.1. MECANISMOS DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPLEXOS DE TERRAS RARAS

A fim de explicar o mecanismo de excitação e emissão que dão origem a fluorescência dos complexos lantanídicos é conveniente fazer referência a um diagrama de níveis de energia e observar os possíveis caminhos de migração desta energia nestes complexos.

Na tentativa de explicação dessa migração de energia muitos mecanismos tem sido propostos, que podem ser de caráter

intermolecular ou intramolecular.

Entre estes, citaremos o mecanismo de caráter intramolecular que é o mais razoável para explicar o comportamento dos quelatos de terras raras que foi proposto por WHAN e CROSBY.<sup>(69,70)</sup>

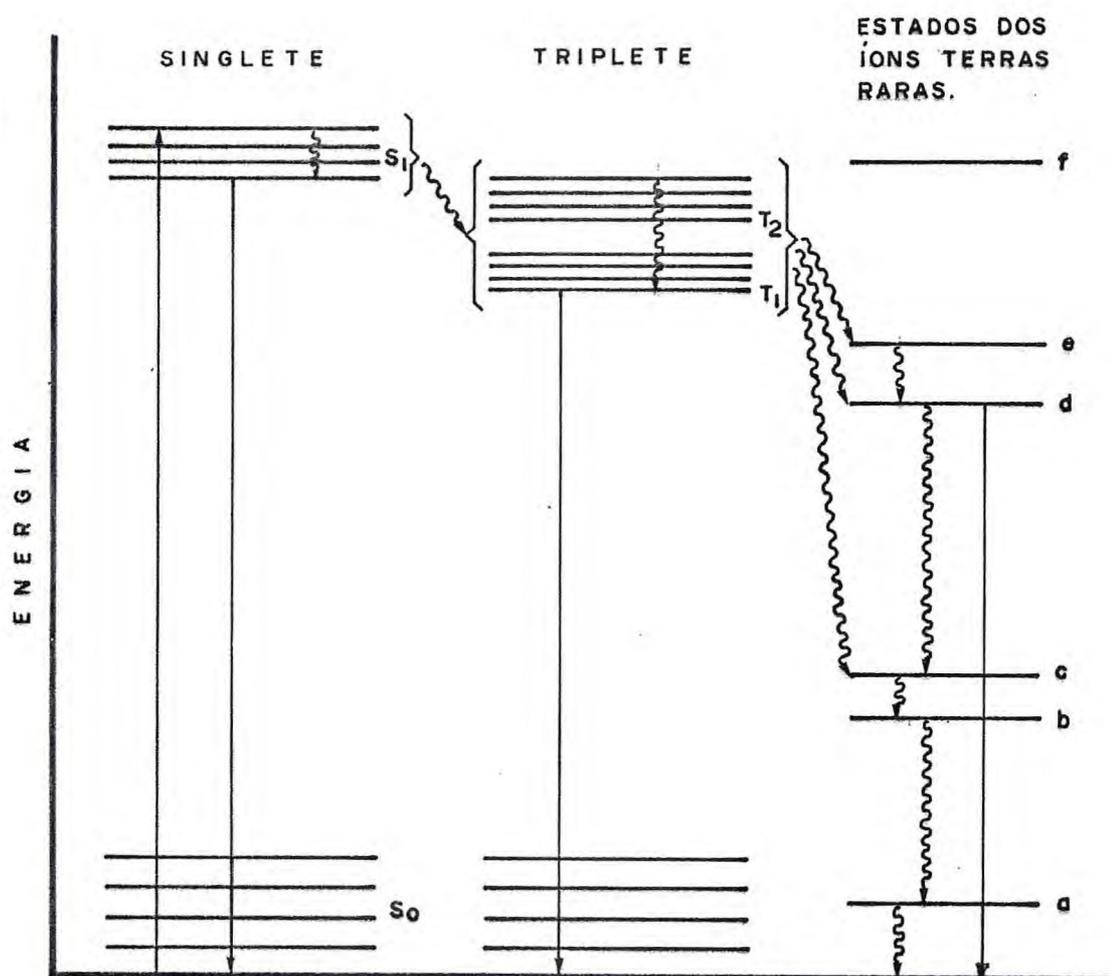


Figura 25 - Mecanismo intramolecular de transferência de energia para quelatos de terras raras. <sup>(69)</sup>

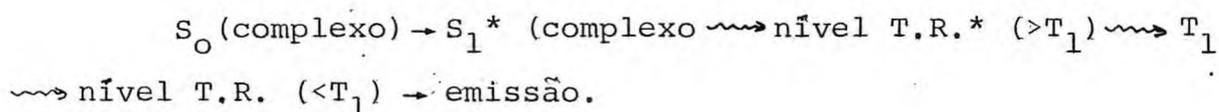
Após excitação do quelato ao nível vibracional do primeiro estado excitado, ( $S_0 \rightarrow S_1^*$ ) a molécula sofre rápida conversão interna para níveis vibracionais mais baixos através de interação com o solvente matriz. O estado excitado pode ser desativado por combinação radiativa com o estado fundamental ( $S_0 \leftarrow S_1^*$ ) resultando na fluorescência molecular, ou a molécula pode sofrer cruzamento intersistema não radiativo do sistema singlete para o tripleto.

Novamente por conversão interna a molécula pode alcançar o estado tripleto mais baixo,  $T_1$ . Deste estado ele pode então se combinar radiativamente com o estado fundamental através de uma transição proibida por spin ( $S_0 \leftarrow T_1^*$ ) dando uma típica fosforescência molecular.

Alternativamente a molécula pode sofrer uma transição não radiativa do sistema tripleto aos níveis de energia do íon terra rara. Após essa excitação indireta por transferência de energia o íon metálico pode sofrer uma transição radiativa para o mais baixo estado do íon resultando uma linha de emissão característica, ou pode ser desativado via processo não radiativo.

BHAUMIK e ELSAYED<sup>(71)</sup> também observaram um outro mecanismo de caracter intramolecular de transferência de energia. Este tipo de mecanismo é sugerido para os quelatos de terras raras em que as moléculas orgânicas são relacionadas de maneira que os níveis mais baixos singlete e tripleto se superpõem com

os níveis do quelato, como indicado abaixo.



Os mecanismos acima citados constituem mecanismos nos quais a energia de excitação é transferida do ligante para o íon terra rara  $S_0(\text{complexo}) \rightarrow S_1^*(\text{complexo})$  o que na verdade significa absorção de energia pelo ligante.

No entanto se o ligante não absorve radiação, a excitação poderá ocorrer via banda de transferência de carga ou diretamente nos outros níveis do íon terra rara, como proposto por KREHER e BUTTER. (72)

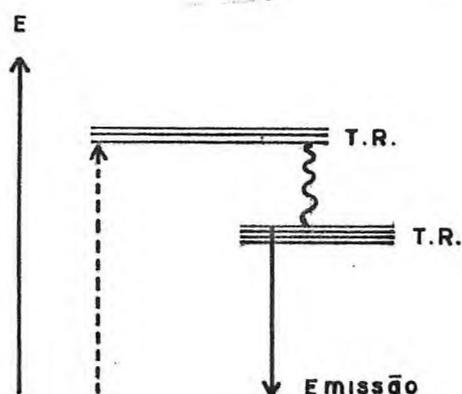


Figura 26 - Mecanismo por excitação direta  $S_0(\text{complexo}) \rightarrow \text{nível T.R.}^* \rightarrow \text{emissão}$

SERRA<sup>(73)</sup> também observou esse mecanismo de excitação direta em seus estudos com compostos de Eu(III).

Um outro mecanismo considerado é o mecanismo intermolecular de transferência de energia, onde a excitação não é absorvida pelo centro luminescente, mas por outro centro, que ao

absorver energia a transfere para o íon terra rara emissor. Este mecanismo difere do mecanismo intramolecular pelo fato de que a transferência de energia é de uma molécula ou íon não coordenado ao íon emissor. Como exemplo, acetonas e aldeídos aromáticos não complexionados ao metal que transferem energia para Eu(III) e Tb(III) em solução aquosa. (74)

#### 4.2. CARATER DAS TRANSIÇÕES

Os espectros de absorção das terras raras são conhecidos na forma gasosa, cristalina e em solução. As linhas de fluorescência são originárias das transições internas 4f e são as mais estudadas do espectro eletrônico dos lantanídeos.

Os cloretos anidros de todos os íons terras raras mostraram uma linha de fluorescência por excitação direta destes íons. (75) No entanto se os cristais hidratados são excitados apenas cinco desses íons emitem. Gadolínio(III), Têrbio(III) e Európio(III) mais fortemente, Samário(III) e Disprósio(III) mais fracamente e quanto aos outros íons restantes mostram muito fraca ou nenhuma fluorescência. (76)

De modo geral essas bandas de absorção observadas na região do visível e U.V. próximos ocorrem na forma de linhas estreitas e fracas indicando que os orbitais f estão bem protegidos, ou seja existe pouca influência do campo cristalino sobre os níveis de energia. (77)

Em adição ao que foi mencionado, as transições  $f^n$  são

formalmente proibidas por paridade e pelas regras da mecânica quântica.<sup>(77)</sup> Vários mecanismos tem sido propostos que causam a "quebra" dessas regras de seleção que incluem: a) mecanismo de dipolo elétrico (envolvendo acoplamento com estados de paridade oposta), b) mecanismo de dipolo magnético e c) mecanismo de transições quadrupolo elétricas.

Nos espectros dos compostos de terras raras as transições que ocorrem, na sua maioria tem caráter de D.E.

JUDD<sup>(78)</sup> e OFELT<sup>(79)</sup> realizaram um estudo teórico para o cálculo das intensidade das transições de D.E. induzido dentro da configuração  $4f^n$ . A teoria de grupo é também utilizada para os cálculos das energias dos níveis eletrônicos com a aplicação do método de RACAHA<sup>(80)</sup> e teoremas de WIGNER-ECKART.<sup>(80)</sup>

De todas essas teorias várias regras de seleção podem ser extraídas e estão contidas nestes símbolos  $3_j$  e  $6_j$ , que devem obedecer a certas condições (ditas de triangularidade).

Transições de dipolo elétrico<sup>(81)</sup>

$$\Delta S = 0$$

$$\Delta l = 1$$

$$|\Delta L| \leq 6 \quad \Delta L = 0, \pm 1, \pm 2$$

$$|\Delta J| \leq 6$$

Para o nível  $J=0$ , as únicas transições permitidas serão  $\Delta J = 2, 4$  ou  $6$ .

Transições de dipolo magnético<sup>(81)</sup>

$$\Delta l = 0$$

$$\Delta S = 0$$

$$\Delta L = 0$$

$$\Delta J = 0, \pm 1 \text{ (exceto } 0 \rightarrow 0)$$

Transições de quadrupolo elétrico<sup>(81)</sup>

$$\Delta l = 0$$

$$\Delta S = 0$$

$$|\Delta L| \leq 2$$

$$|\Delta J| \leq 2$$

De especial significado são as transições hipersensitivas<sup>(77,82)</sup> as quais acredita-se ser de origem quadrupolo elétricos, que normalmente obedecem as regras de seleção  $|\Delta J|=2$ . Essas são mais sensíveis ao envolvimento dos íons que as transições normais f-f e podem portanto ser úteis em mostrar o envolvimento dos íons lantanídeos tal como nos complexos.

#### 4.3. CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM AS PROPRIEDADES DE FLUORESCÊNCIA

O número de transições possíveis entre os íons terras raras depende da configuração eletrônica. Portanto é possível separar esses íons em classes de acordo com o nº de transições.<sup>(83)</sup>

WHAN e CROSBY<sup>(70)</sup> dividiram os íons trivalentes dos lan

tanídeos em 3 classes com base nas suas propriedades fluorescentes.

1a. classe: La(III), Gd(III), Lu(III). A configuração destes íons corresponde respectivamente  $4f^0$ ,  $4f^7$  e  $4f^{14}$ , ou seja, no caso de La(III) em que os orbitais estão vazios ou no caso do Lu(III) em que os orbitais estão totalmente preenchidos, nenhuma transição pode se originar desses estados e portanto a transferência de energia do triplete para o íon terra rara não pode acontecer. Para o íon Gd(III), consta que o seu primeiro nível excitado encontra-se acima do estado triplete do ligante.

Nestes complexos a energia absorvida aparece como forte fluorescência molecular e fosforescência.

2a. classe: Sm(III), Eu(III), Tb(III) e Dy(III). Neste grupo ( $4f^5$  a  $4f^9$ ) os complexos apresentam uma fluorescência bastante intensa, devido a proximidade de níveis excitados com o estado triplete do ligante, permitindo assim, uma eficiente transferência de energia.

3a. classe: Pr(III), Nd(III), Ho(III), Er(III), Tm(III), Yb(III). Nestes complexos a fraca fluorescência indica uma eficiente transferência de energia do estado singlete para o triplete facilitando portanto as transições não radiativas, ao mesmo tempo que permite fraca fosforescência.

No esquema apresentado na Figura 27<sup>(84)</sup> vê-se a separação de cada um desses grupos de acordo com as suas propriedades de fluorescência. O mecanismo de fluorescência para cada um

desses grupos já havia sido realizado por CROSBY e KASHA<sup>(84)</sup> em trabalhos anteriores com vários quelatos de íons lantanídeos.

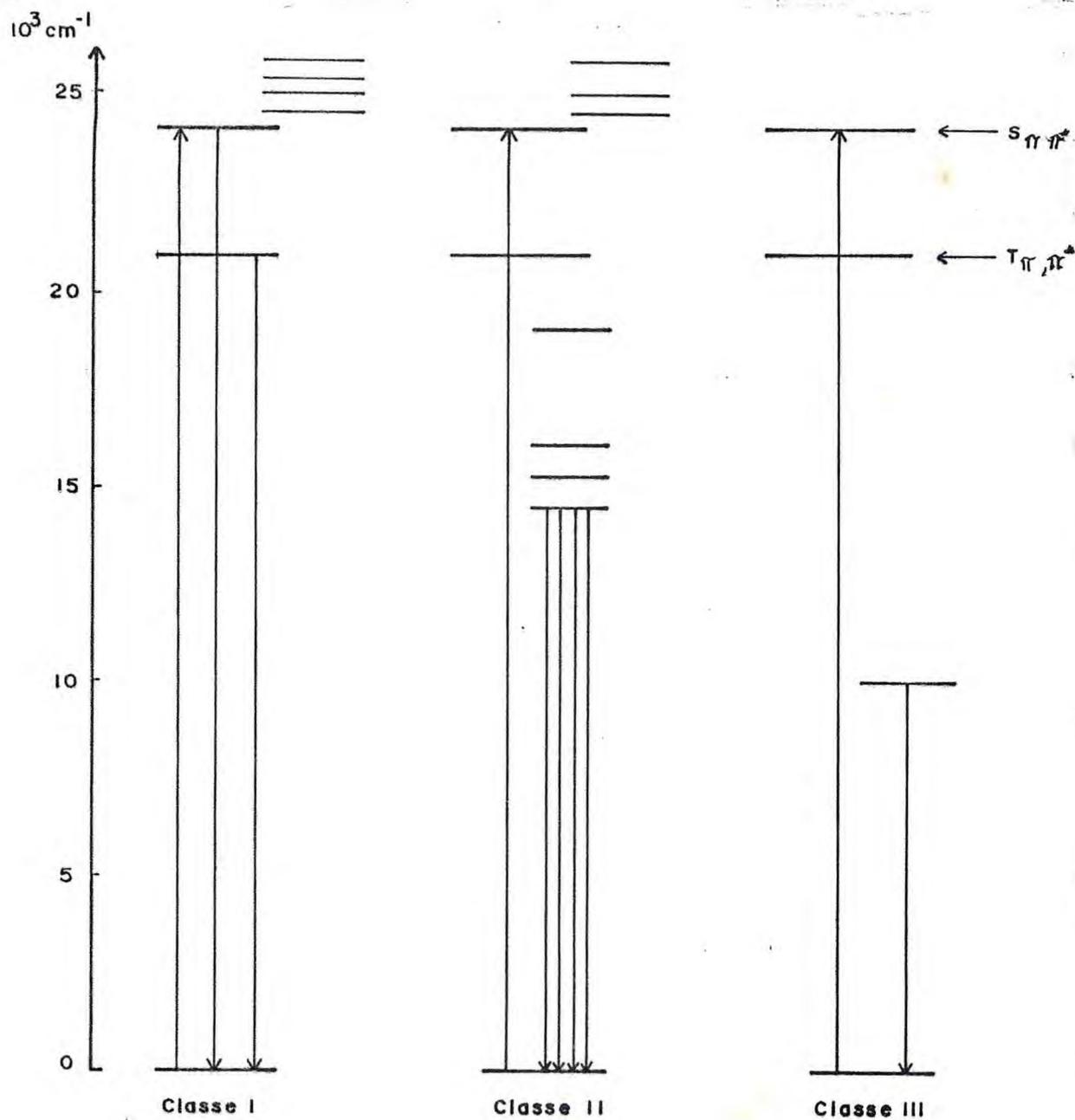


Figura 27 - Classificação dos quelatos de terras raras com base nas suas propriedades fluorescentes.<sup>(84)</sup>

Através do diagrama (Figura 27) apresentado podemos concluir que para que seja observada fluorescência nestes complexos de terras raras deve existir uma diferença de energia apropriada entre o nível fundamental e o primeiro nível excitado.

O diagrama de nível de energia do Eu(III), Sm(III), Tb(III) e Dy(III) como adaptado por DIEKE e CROSSWHITE<sup>(85)</sup> é dado na Figura 28. As linhas dão uma idéia do desdobramento do campo cristalino. Pode parecer também, a partir da observação do diagrama (Figura 28), que seriam muitos os níveis excitados, no entanto poucos são os estados de origem de fluorescência e estes são designados como níveis de ressonância. Uma circunstância que certamente facilita a interpretação dos resultados nos complexos quelatos.

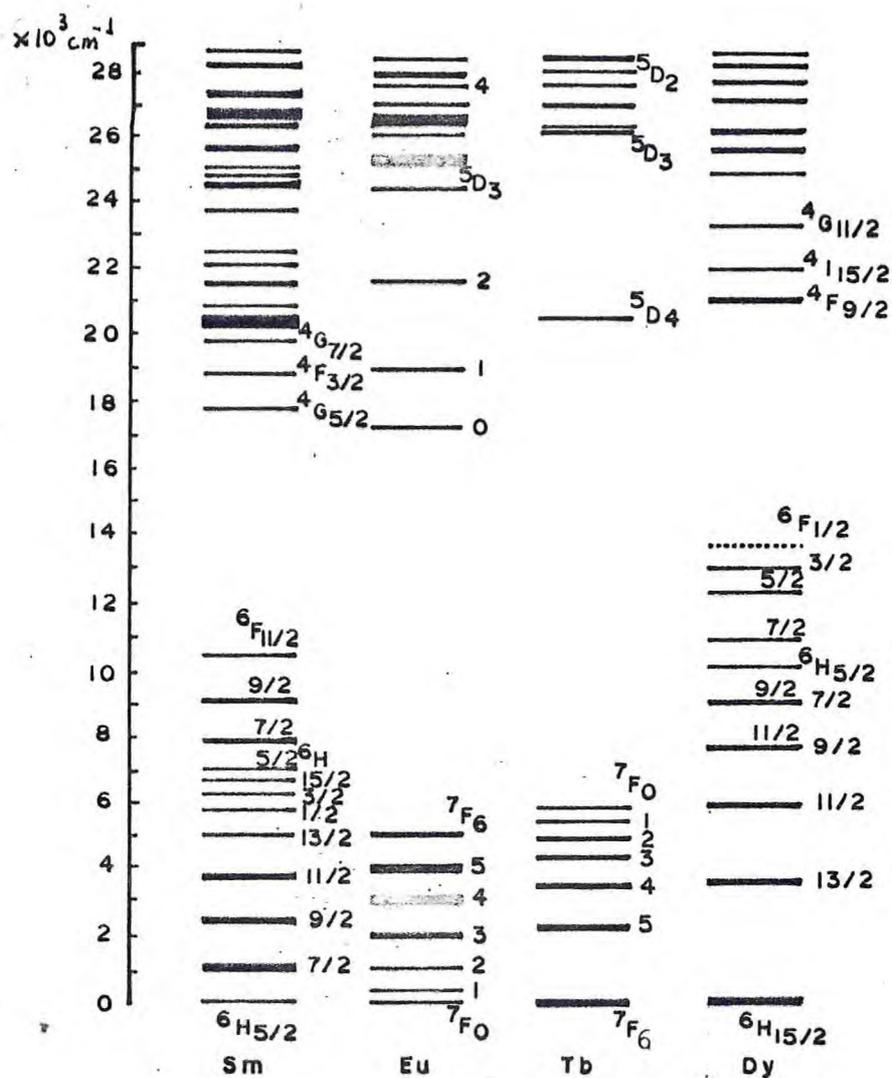


Figura 28 - Diagrama dos níveis de energia dos íons Sm(III), Eu(III), Tb(III) e Dy(III). (85)

#### 4.4. INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO ÍON

Como foi dito, os complexos dos íons Eu(III), Sm(III), Tb(III) e Dy(III) do segundo grupo são os que apresentam propriedades de fluorescência mais favoráveis. (77) As intensidades das linhas de emissão são relativamente baixas, a menos que haja transferência de energia de um nível tripleto do ligante para as terras raras, ocorrendo então, uma grande intensificação nessas linhas.

É observado no entanto, que mesmo na ausência de cruzamento intersistema um efeito na intensificação pode ser obtido pela própria quelação, que pode aumentar em algumas vezes as linhas de emissão do espectro. Um exemplo disso é verificado na formação do complexo Eu-EDTA em meio aquoso, onde a fluorescência da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  do Európio é aumentada de 100 vezes. (86)

Para quelatos de  $Tb^{3+}$  e  $Eu^{3+}$  também foram observadas intensificação nas linhas de seus espectros, quando trabalhou-se com  $D_2O$  ao invés de  $H_2O$ . Os aumentos foram de 7 a 20 vezes respectivamente. (87)

Estudos realizados por HORROCKS e col. (88,89) tem mostrado o quanto as medidas de luminescência do  $Tb^{3+}$  e do  $Eu^{3+}$  ambas em  $D_2O$  e  $H_2O$  fornecem uma medida acurada do número de moléculas de  $H_2O$  coordenadas ao íon lantanídeo, quando este é envolvido numa ligação com uma macromolécula.

KROOP e WINDSOR<sup>(90)</sup> também relataram estudos onde verificaram a dissociação de sais de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  através das medidas das intensidades de fluorescência ( $\text{ID}_2\text{O}/\text{IH}_2\text{O}$ ). Hipersensitividade, portanto pode ser empregada para mostrar mudanças no envolvimento do íon metálico.

Nesta etapa, convém mencionar os fatores das quais depende a intensidade de fluorescência do íon metálico.

A intensidade de fluorescência é principalmente controlada por dois fatores; a) a habilidade do estado triplete receber energia do estado singlete e transferir essa energia ao nível de ressonância do íon. Portanto é bastante sensível a natureza do íon, do ligante e da própria ligação. b) a extensão em que ocorre desativação radiativa de excitação (conversão interna e externa), que, evidentemente, compete com os processos que possibilitam as transições radiativas (fluorescência).

Os fatores de desativação radiativa ou de supressão de energia podem ocorrer de qualquer dos níveis excitados ou mesmo após a excitação ter alcançado o íon terra rara. Neste caso, o íon, o ligante e o solvente tomam parte nesta desativação. Além disso o efeito de temperatura também tem um papel importante.

Os efeitos de supressão podem ser discutidos ligeiramente.

a) efeito do solvente<sup>(91)</sup>

O efeito do solvente na intensidade de fluorescência do

ion tem sido observado por WEISSMAN<sup>(68)</sup> em seus trabalhos. Já tivemos oportunidade de mencionar este efeito através do que falamos anteriormente a respeito da substituição de H<sub>2</sub>O por D<sub>2</sub>O e que provoca um aumento na intensificação de fluorescência de soluções de Tb(III) e Eu(III).<sup>(90)</sup>

Estes resultados mostram o papel da vibração do hidrogênio no processo de desativação não radiativa. Quanto menor o número de quantas vibracionais necessários para se alcançar uma diferença de energia, maior é a probabilidade de decaimento radiativo. Assim sendo, a intensidade de fluorescência é maior quando em solventes deuterados.

Vibrações de alta energia tais como O-H e C-H favorecem as transições não radiativas, logo são supressores efetivos de fluorescência.

De acordo com GALLAGHER<sup>(86)</sup> a introdução de um simples grupo OH na esfera de coordenação interna do Eu(III) foi suficiente para reduzir a meia vida de fluorescência do estado  $^5D_0$  de 3,9 a 0,12 msec.

b) efeito do ligante<sup>(91)</sup>

Assim como ocorre com os solventes, ligantes que contêm vibrações altamente energéticas, como as de estiramento dos grupos O-H e C-H, também são supressores de fluorescência, ou seja quanto menor a energia de vibração maior a probabilidade de decaimento radiativo.

c) efeito da temperatura

De modo geral, um aumento de temperatura diminui o rendimento quântico de fluorescência.

FILIPESCU e McAVOY<sup>(92)</sup> concluiu que um aumento na supressão a temperaturas mais altas é devido a dissociação do solvente-quelato complexo, possibilitando a remoção dos efeitos positivos e um aumento na probabilidade de desativação por colisão. Consequentemente a eficiência de transferência de energia para os terras raras diminui a altas temperaturas.

SINHA<sup>(91)</sup> entretanto observou que para alguns quelatos de Európio a temperatura não tem muito efeito na intensidade de fluorescência.

d) outros

Outros efeitos que contribuem para a supressão de fluorescência tem sido sugerido; supressão por presença de O<sub>2</sub>,<sup>(93)</sup> supressão por impurezas,<sup>(71,94)</sup> é por diminuição de viscosidade do solvente.<sup>(95)</sup>

#### 4.5. CASO ESPECÍFICO DA FLUORESCÊNCIA DO TÉRBIO(III)

Dentre as terras raras, que apresentam fluorescência na região do visível, (Sm(III), Eu(III), Tb(III) e Dy(III)) o Tb(III) é o que apresenta fluorescência mais intensa (cor verde), uma propriedade que lhe confere muitas aplicações,

O íon Tb(III) é bastante utilizado como "sonda" espec

troscópico na investigação de muitos sistemas biológicos. (77,96,97,98)

Além disso, existe um grande interesse na área industrial com respeito a utilização deste íon como "phosphor" em telas de T.V. a cores e no campo da iluminação. (99)

Os níveis de energia do Tb(III), que possui configuração eletrônica  $[\text{Xe}]4f^8$  e portanto estado fundamental  $^7F_6$  são mostrados na Figura 29 (89) juntamente com os outros estados que participam das transições eletrônicas.



A designação dos termos que representam os estados energéticos, assim como o cálculo desses níveis de energia, fogem aos objetivos deste trabalho mas encontram explicação no livro do CARO<sup>(80)</sup> e nos artigos de JUDD<sup>(78)</sup> e OFELT<sup>(79)</sup> e de CARNALL e col.<sup>(100)</sup>

Quando excitado Tb(III) emite luz visível de 4 bandas espectrais que ocorrem em 488, 543, 585 e 620nm.<sup>(95)</sup> De acordo com THOMAS e col.<sup>(101)</sup> essas bandas correspondem a transição do nível  $^5D_4$  para os níveis  $^7F_6$ ,  $^7F_5$ ,  $^7F_4$ ,  $^7F_3$  respectivamente.

A mais intensa dessas bandas é a que ocorre em 543nm e é devido a transição  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ , que produz uma emissão verde característica. A emissão do estado  $^5D_4$  pode ser conseguida de dois modos; por excitação direta, que requer uma intensa fonte de luz (devido a baixa absorvidade molar do Tb), ou pela indireta e potencialmente mais sensitiva, excitação por transferência de energia, na qual o  $Tb^{+3}$  recebe energia por transferência de um doador eficiente.<sup>(97)</sup>

Em casos favoráveis um aumento na intensidade de fluorescência do  $Tb^{+3}$  pode alcançar um fator de  $10^2-10^6$ .<sup>(97)</sup>

Nem sempre a intensificação é tão elevada. No caso observado para o estudo de interação de  $Tb^{3+}$  com poliacrilamidas,<sup>(95)</sup> onde o mecanismo é por excitação direta do próprio íon, foi verificado um aumento de 7 vezes. A sensibilidade da luminescência do  $Tb^{3+}$  em presença de gelatina<sup>(102)</sup> é aumentada

de 100 vezes. A intensificação das linhas espectrais é devido a interação entre o ligante e o íon metálico  $Tb^{3+}$ .

#### 4.6. FLUORESCÊNCIA DOS ÍONS TERRAS RARAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Os íons terras raras não tem funções biológicas e somente pequenos traços são encontrados em toda a análise do corpo humano. (77)

Desde que essas terras raras são classificadas como ácidos duros (classe A) e tem raio iônico (0.848-1.061 Å) (103) comparável ao cálcio (1.060 Å) um grande número de processos biológicos tem sido estudados utilizando esses íons como "sonda". Além disso, o cálcio, assim como outros metais envolvidos nas reações biológicas, não oferecem a riqueza de propriedades espectroscópicas que alguns lantanídeos oferecem. Um número bastante significativo de aplicações destes íons em processos biológicos foi publicado por NIEBOER. (77)

Os primeiros trabalhos, neste sentido, foram realizados por BIRNBAUM e col. (104) que sugeriram o uso dos íons lantanídeos como substituto dos íons metais alcalinos terrosos. Desse modo os íons lantanídeos puderam ser utilizados na investigação dos sítios de ligação das proteínas, (105) através do uso de suas propriedades espectrais.

Posteriormente esta técnica foi estendida aos ácidos nucleicos e derivados. (106-108)

Particularmente os estudos que utilizam espectroscopia ' de fluorescência merecem atenção especial.

Muitos estudos de fluorescência tem sido realizados principalmente com os íons Eu(III) e Tb(III) no intuito de investigar a interação de íons metálicos com várias macromoléculas biológicas.

A maioria das pesquisas biológicas que envolvem luminescência do Tb(III) estão voltadas para o estudo da força e da estequiometria do íon ligado. Em todos os casos a sensitização da luminescência do Tb(III), que frequentemente ocorre após ligação deste íon a uma proteína ou outra molécula, tem sido um requerimento necessário.

Tem-se verificado<sup>(88,89)</sup> também, o quanto as medidas de luminescência (meia vida) fornecem medidas acuradas quanto ao número de moléculas coordenadas ao íon Ln(III) quando este está ligado a uma macromolécula.

Uma das melhores sondas espectroscópicas para o cálcio no sítio da ligação das proteínas é o Têrbio(III)<sup>(97)</sup>. A fluorescência do Têrbio(III) quando ligado a certas proteínas é aumentada por um fator de  $10^3$  a  $10^5$ . Tal aumento foi observado para a transferina,<sup>(109)</sup> concanavalina A,<sup>(110)</sup> tripsina,<sup>(111)</sup> conalbumina,<sup>(112)</sup> troponina,<sup>(98)</sup> parvalbumina<sup>(113)</sup> etc...

Intensificação da fluorescência do Têrbio(III) e Europio(III) também foi verificada para complexos destes íons com tRNA proveniente de Escherichia coli. KAYNE e COHN<sup>(107)</sup> mostraram o poten -

cial destes íons para estudos das estruturas dos polinucleotídeos. No caso de moléculas de tRNA de E. coli uma típica curva de titulação fluorimétrica indica que aproximadamente 4 íons de Europio(III) estão ligados por mol de tRNA. Estudos mais detalhados indicam que os íons lantanídeos são firmemente ligados ao ácido nucleico e que a unidade 4-tiouridina é responsável pelo aumento da luminescência.

O trabalho de EPSTEIN, LEWITZ e REUBEN<sup>(111)</sup> também mostra aspectos interessantes no estudo fluorimétrico do complexo  $Tb^{+3}$  - tripsina. A magnitude da intensificação observada foi usada para verificar a competição de outros íons pela ligação. Lantanídeos trivalentes competem com  $Ca^{2+}$  pelo sítio de ligação na tripsina. Suas ligações no entanto são um pouco desfavorecidas pela alta carga. Os íons divalentes  $Mn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  se ligam tão fortemente quanto o  $Ca^{+2}$ . Por outro lado  $Sr^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  se ligam a tripsina com pouca afinidade. A dependência do pH para a ligação do térbio na tripsina indica que o íon metálico é ligado aos carboxilatos existentes nesta proteína, de acordo com a reação:



Observando-se a curva de intensidade de fluorescência x pH fica evidenciado que nenhum proton é desprendido senão entre os pHs 4.0 e 6.3 após adição de  $Ca^{+2}$  ou  $Tb^{+3}$ . Acima deste pH ocorre saturação dos pontos de coordenação.

MIKKELSEN e WALLACH<sup>(114)</sup> tem explorado a utilidade de íons lantanídeos, como "sonda" para o sítio de ligação do cál

15

cio nas biomembranas, usando eritrócitos. Evidências de que o  $Tb^{+3}$  está ligado ao mesmo sítio de ligação do cálcio é confirmada pela habilidade do  $Ca^{+2}$  para deslocar  $Tb^{+3}$ . O complexo  $Tb^{+3}$ -eritrócito também foi titulado com  $Mg^{+2}$  e competição menos efetiva foi observada.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. REAGENTES

#### Dextrana

A dextrana utilizada nos experimentos tem peso molecular 60.000-90.000 e é de procedência NBCo.

Os testes de estabilidade indicaram que as soluções, de concentração até 35% (p/v) conservam até por 30 dias seu aspecto inicial, não apresentando turbidez, nem partículas em suspensão. Apesar disso, em todos os experimentos, as soluções foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas.

Os espectros na região do infravermelho e de ressonância nuclear magnética ( $^1\text{H}$  RMN) foram registrados para melhor caracterização da macromolécula.

#### $\text{TbCl}_3$

O cloreto de térbio foi obtido a partir do óxido  $\text{Tb}_4\text{O}_7$  (99,9% alfa products) que foi purificado<sup>(95)</sup> e tratado com ácido clorídrico para obtenção do cloreto.

#### Tampão trishidroximetilaminometano

O reagente é de procedência MERCK. O tampão pH 6.6 foi obtido preparando-se uma solução 0,029M do sal e adicionando-se HCl concentrado até que o pH necessário fosse alcançado.

O tampão assim preparado é conservado a baixa temperatura

ra ( $\approx 10^{\circ}\text{C}$ ) por no máximo 30 dias,

Outros reagentes (procedência)

- $\alpha$  metilglicosídeo 99% da "Aldrich Chemical Company"
- NaCl,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  do CARLO ERBA
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  da MERCK
- Os reagentes restantes foram todos de grau analítico.

## 5.2. APARELHAGEM E METODOLOGIA

### 5.2.1. Espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando-se o espectrofluorímetro tipo MPF 44B - PERKIN ELMER. O aparelho tem dois monocromadores (excitação e emissão) e resolução  $0,2\text{\AA}$ . A fonte de excitação é a lâmpada de xenônio de 150W. Em todas as experiências as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e usou-se células de quartzo retangulares com 1cm de caminho ótico.

#### Titulações fluorimétricas da dextrana

As titulações fluorimétricas foram realizadas com e sem a presença da dextrana (0,05M) com as soluções em 3 pHs diferentes (3.0, 4.4 e 6.6).

Alíquotas de 3ml de cada uma das referidas soluções foram tituladas com  $\text{TbCl}_3$  0,2M. Pequenas quantidades ( $\mu\text{l}$ ) do sal foram adicionadas com auxílio de micropipetas e em seguida eram agitadas a fim de que o meio permanecesse homogêneo.

O comprimento de onda de excitação foi 290nm e foi registrada a banda de emissão em 543nm, que é a mais intensa do espectro de  $\text{TbCl}_3$ . As fendas de emissão e excitação foram de 10nm. Para diminuir o efeito da luz espalhada foi utilizado o filtro 31.

## titulação fluorimétrica do $\alpha$ metil glicosídeo

O procedimento foi o mesmo utilizado para obtenção das curvas de titulação fluorimétrica da dextrana, sendo que a titulação foi realizada apenas para pH 6,6.

A concentração do  $\alpha$  metil glicosídeo foi de (0,05M) e tanto o procedimento como as especificações do aparelho foram mantidos constantes.

### 5.2.2. Absorção no infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho da dextrana foi obtido com o espectrofotômetro da PERKIN ELMER modelo 1320 na região  $4.000$  a  $600\text{cm}^{-1}$ . A amostra sólida foi preparada em disco de KBr.

### 5.2.3. Ressonância nuclear magnética ( $^1\text{H}$ RMN)

O registro do espectro foi obtido em um espectrofotômetro modelo EM 360 da VARIAN que operou com 60MHz. O solvente foi o  $\text{D}_2\text{O}$  e foi utilizado como padrão externo o tetrametilsilano.

### 5.2.4. Medidas de pH

A obtenção do pH das soluções foram controladas usando-se o potenciômetro KNICK tipo 510 nº 364, equipado com eletrodo de vidro e calomelano.

As soluções de pH 3.0 e 4.4 foram obtidas por adição de HCl enquanto que para a de pH 6.6 utilizou-se solução aquosa de tampão tris.

#### 5.2.5. Dispersão ótica rotatória (ORD)

O aparelho utilizado foi o espectropolarímetro CARY 60. Usou-se células de quartzo de 1cm de caminho ótico e lâmpada de xenônio de alta pressão.

As curvas de O.R.D. foram obtidas para as soluções de dextrana 0,05M e dextrana em presença do metal (Tb(III) 0,02M). As soluções foram tamponadas com tris pH 6.6.

#### 5.2.6. Viscosidade

Para as medidas relativas de viscosidade, utilizamos o viscosímetro tipo OSTWALD<sup>(115)</sup> com diâmetro capilar 0,5mm, sendo o tempo de escoamento do tris (90 segundos). A temperatura foi controlada, por imersão do sistema em banho de água termostático, obtendo-se  $30.0 \pm 0.1$ .

#### 5.2.7. Espalhamento

A intensidade de luz espalhada das soluções foram medidas no espectrofluorímetro MPF-44B, já anteriormente especificado.

Mediu-se a radiação espalhada a 90° das soluções de dextrana e de dextrana com tório, usando-se o comprimento de

onda 650nm (onde não há absorção de luz pelos componentes do sistema).

#### Titulações nefelométricas

As titulações nefelométricas foram realizadas do mesmo modo que as titulações fluorimétricas no que diz respeito ao volume utilizado e concentração das soluções. No entanto foram realizadas apenas com as soluções a pHs 3.0 e 4.4, uma vez que a própria solução de  $TbCl_3$  a pH 6.6 apresentava grande espalhamento.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. INVESTIGAÇÃO DA ESTRUTURA DA DEXTRANA

Os métodos usados na investigação da estrutura de polímeros de maneira geral já foram bastante discutidos anteriormente.

Particularmente para a dextrana, além dos métodos puramente químicos já mencionados, os métodos físicos também tem um grande significado.

Entre estes métodos, escolhemos a espectroscopia no infravermelho e a espectroscopia de ressonância nuclear magnética ( $^1\text{H}$  RMN) a fim de obtermos informações com respeito a estrutura da dextrana utilizada em nosso experimento.

#### 6.1.1. $^1\text{H}$ RMN

Espectroscopia de ressonância nuclear magnética tem mostrado ser uma técnica poderosa na investigação da estrutura de moléculas orgânicas. Em particular  $^1\text{H}$  RMN oferece para a química dos carboidratos um método eficaz na determinação das conformações dos carboidratos em solução<sup>(30,116)</sup> a última contribuição é particularmente valiosa em vista da importância do controle conformacional tanto nas transformações químicas como bioquímicas em solução.

$^1\text{H}$  RNM também foi utilizada por PASIKA e CRAGG<sup>(117)</sup> e mostrou ser útil em detectar presença de ramificação na dextrana.

Com base neste trabalho utilizamos  $^1\text{H}$  RNM para verificar, na dextrana(NBCo) utilizada em nosso experimento a presença ou não de ramificação.

Para facilitar a discussão dos resultados reproduzimos aqui os espectros obtidos pelos autores e as atribuições que foram feitas com relação aos picos nos espectros.

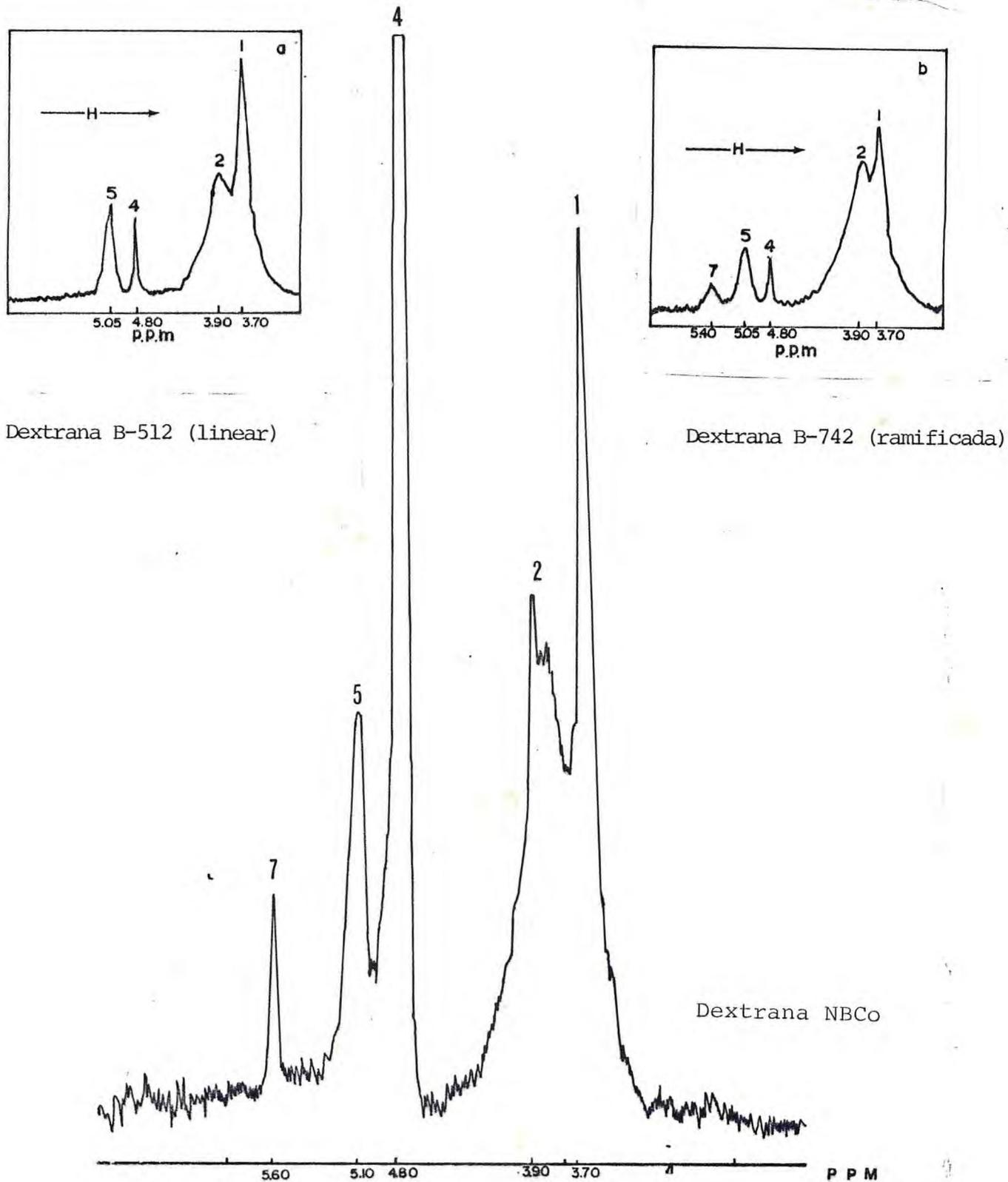


Figura 30 - Espectros de  $^1\text{H}$  NMR das dextrans B-512, B-742 e NBCo.

Tabela 11 - Posições e designações dos picos para a dextrana.

Espectro	Pico	Protons responsáveis	Deslocamento químico (ppm)
Dextrana B-512 <sup>(117)</sup> (linear)	1	C-5, C-6	-3.70
	2	C-2, C-3, C-4	-3.90
	4	D <sub>2</sub> O	-4.80
	5	C-1 (ligação 1-6)	-5.05
Dextrana B-742 <sup>(117)</sup> (ramificada)	1	C-5, C-6	-3.70
	2	C-2, C-3, C-4	-3.90
	4	D <sub>2</sub> O	-4.80
	5	C-1 (ligação 1-6)	-5.05
	7	C-1 (ramificação)	-5.40
Dextrana NBCo	1	C-5, C-6	-3.70
	2	C-2, C-3, C-4	-3.90
	4	D <sub>2</sub> O	-4.80
	5	C-1 (ligação 1-6)	-5.10
	7	C-1 (ramificação)	-5.60

Padrão externo tetrametilsilano

Os autores<sup>(117)</sup> mostram que a presença de ramificação quer seja  $\alpha$  1-3 ou  $\alpha$  1-4 modifica sensivelmente a vizinhança do carbono<sup>1</sup> na unidade glicosídica da ramificação. Isso pode ser evidenciado pela presença de um pico extra, no espectro de <sup>1</sup>H RNM com relação ao espectro da dextrana linear.

Comparando o espectro de <sup>1</sup>H RNM da dextrana NBCo, utilizada em nosso experimento, com os espectros das dextranas estudadas pelos referidos autores, concluímos ser esta ramificada, pela presença de um pico extra em 5.60 ppm.

## 6.1.2. INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho tem sido bastante aplicada e não foram observadas muitas diferenças nos espectros, a não ser em casos de dextranas tendo estruturas muito diferentes.

BARKER e STACEY (118,119) tem feito referências principalmente aos derivados metilados de açúcares simples e oligossacarídeos. Para esses derivados de glicose, assim como para a dextrana, espera-se que as substituições tendo posições idênticas resultem em similar absorção.

Com base nesse material experimental uma absorção aparecendo em  $914-919\text{cm}^{-1}$  e uma mais fraca em  $766-770\text{cm}^{-1}$  parece ser característica do tipo de ligação 1-6.

A absorção em  $837-841\text{cm}^{-1}$  pode ser considerada característica do tipo de ligação na posição axial do átomo de C-1 da glicose de acordo com a configuração  $\alpha$ .

Identificação de outros tipos de ligação é mais difícil. No que se refere a dextrana contendo ramificação, uma fraca absorção é manifestada em  $793-794\text{cm}^{-1}$ . Isso é considerado principalmente para as substituições 1-3 enquanto que a identificação da substituição em 1-4 é incerta. (120)

A fim de caracterizar a dextrana por nós utilizada, registramos aqui o espectro no infravermelho e através de comparações com os dados encontrados na literatura, (120,121) fare-

mos atribuições para os picos encontrados na região entre 600-1000 $\text{cm}^{-1}$  que são os mais estudados,

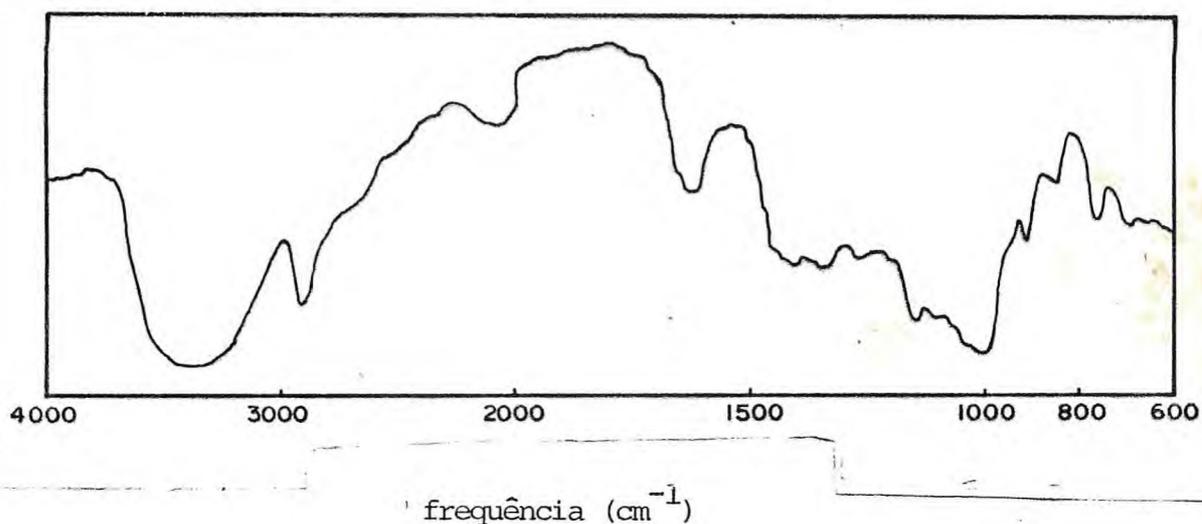


Figura 31 - Espectro no I.V. da dextrana NBCo. (Peso molecular 60.000-90.000). Em disco KBr.

Tabela 12- Bandas de absorção da dextrana NBCo. (600-1000 $\text{cm}^{-1}$ )

Frequência observada ( $\text{cm}^{-1}$ )	atribuições
$\approx 840$	Vibrações de deformação do C-H anomérico equatorial de acordo com a configuração $\alpha$ .
$\approx 760$	Característica do tipo de ligação 1-6
$\approx 910$	Característica do tipo da ligação 1-6

Uma banda  $790\text{cm}^{-1}$  é geralmente encontrada para as dextranas ramificadas e tem sido atribuída a ramificação  $\alpha$ 1-3. Entretanto esta banda pode não estar claramente definida, (nos casos de amostras hidratadas), quando aparece uma banda em  $800\text{cm}^{-1}$  e interfere no aparecimento da banda de ramificação.

Comentamos anteriormente, que não tem sido observadas grandes diferenças nos espectros de diferentes dextranas. Mostraremos a seguir o espectro no I.V. da dextrana NRRLB-52<sup>(121)</sup> figura 32 (de peso molecular 20000-30000 e contém 5% de ligações  $\alpha$ 1-3 nos pontos de ramificações) que pode ser comparada com o da dextrana NBVo, por nós utilizada. Como podemos observar os espectros são muito semelhantes, e em nenhum dos dois espectros a banda da ramificação parece definida.

Estudos de RNM portanto, parecem ser mais razoáveis para estudos de ramificação.

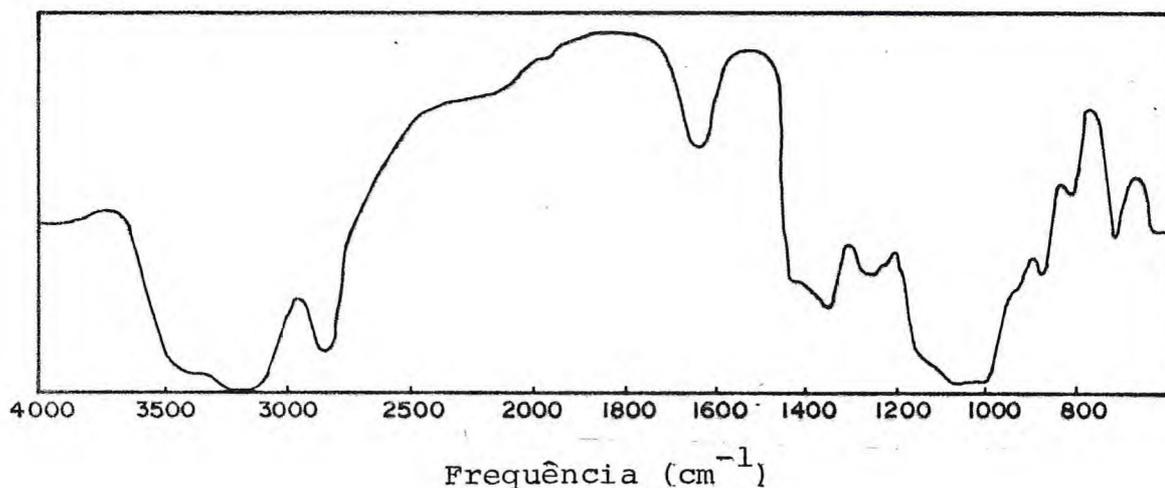


Figura 32 - Espectro no I.V. da dextrana NRRLB-52 (peso molecular 20.000 a 30.000), 5% de ramificação 1-3. Em disco KBr.<sup>(121)</sup>

## 6.2. ESTUDO DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO Tb-DEXTRANA

### 6.2.1. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A intensificação das linhas de emissão do  $TbCl_3$  em presença de determinados ligantes geralmente é atribuída a formação de um complexo, ou seja a uma interação entre o íon metálico e o ligante.

A sensitização do  $Tb(III)$  já foi bastante explorada em capítulo anterior (4) e frequentemente ocorre quando da sua ligação com proteínas ácidos nucleicos etc...

A fim de investigar a interação do  $Tb(III)$  com a dextrana, faz-se necessário constatar a sensitização do Térbio (III) em presença do polímero.

#### 6.2.1a. ESPECTRO DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO DO $Tb(III)$

Iniciamos o nosso trabalho pela observação do espectro de emissão do térbio. Na região de 450 a 650nm o  $TbCl_3$  apresenta 4 bandas espectrais que se situam nas proximidades dos comprimentos de onda 488nm, 543nm, 585nm e 620nm.

Como podemos observar (Figura 33) a banda mais intensa ocorre em 543nm e por isso foi escolhida para obtenção do espectro de excitação do  $TbCl_3$ .

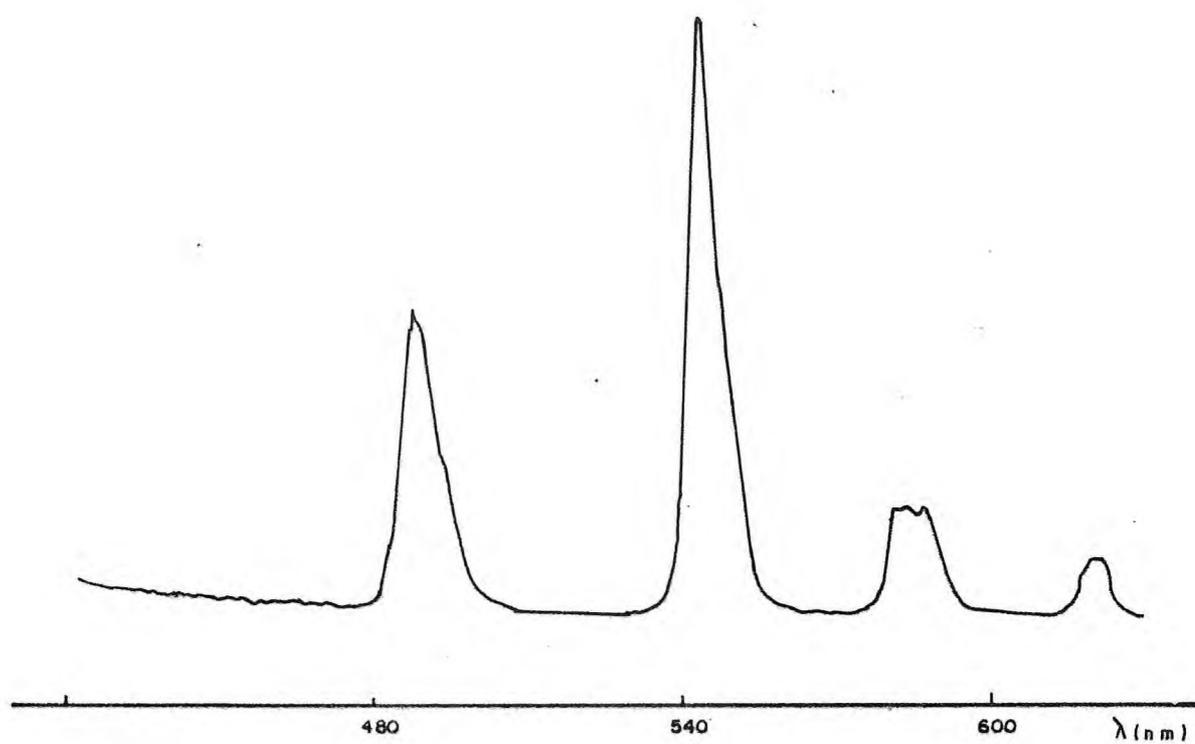


Figura 33 - Espectro de emissão de fluorescência da solução aquosa do  $\text{TbCl}_3$  0.01M.  $\lambda_{\text{exc}} = 290\text{nm}$ .

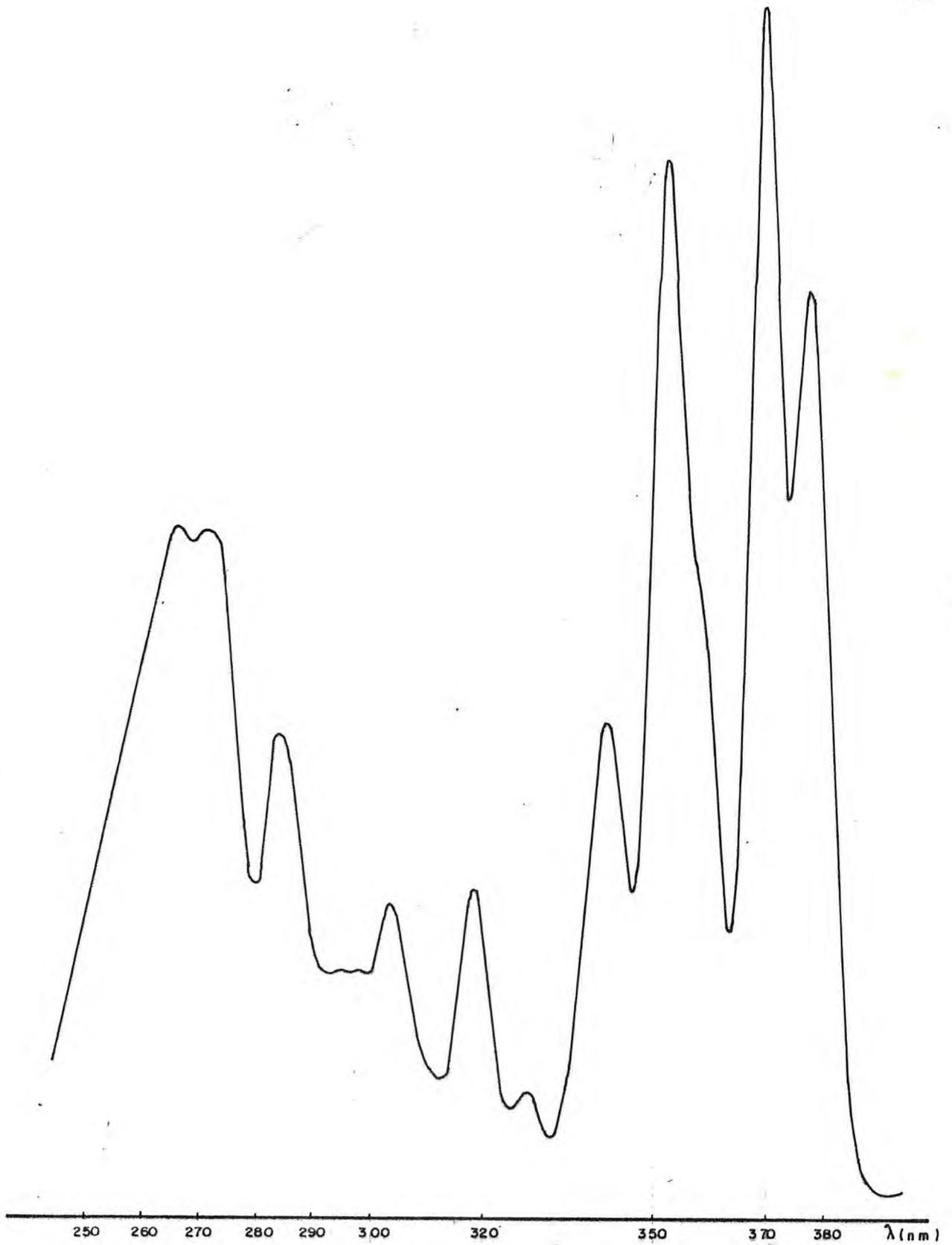


Figura 34 - Espectro de excitação de fluorescência de solução aquosa do TbCl<sub>3</sub> 0.01M.  $\lambda_{em} = 543\text{nm}$ .

## 6.2.1b. INTENSIFICAÇÃO DO Tb(III) EM PRESENÇA DA DEXTRANA

Na impossibilidade do registro do espectro de excitação do  $TbCl_3$  em presença da dextrana verificamos as intensidades de luz emitidas através de vários comprimentos de onda de excitação. Os dados da experiências estão na Tabela 13.

Tabela 13 - Efeito do comprimento de onda na intensidade de fluorescência do Tb(III) ( $5 \times 10^{-3} M$ ) em presença da dextrana (0,05M).

$\lambda$ (nm)	* FDex + Tb	* FTb
250	5,9	2,8
260	16,6	15,1
280	17,7	5,3
290	16,2	0
300	14,9	0
310	6,0	0
320	0	0
330	0	0
340	0	0
350	3,5	3,7
360	5,1	5,6
370	6,7	8,9
380	5,2	5,7
390	0	0
400	0	0
410	0	0
420	0	0
430	0	0
440	0	0

\* unidades arbitrárias.

Com a simples observação dos resultados podemos constatar a sensitização do Tb(III) ( $\lambda_{exc}$  250-310nm) em presença da macromolécula, o que pode ser indicativo de uma interação.

A fim de complementar o estudo anterior verificamos o efeito do pH na intensificação do Tb(III) em presença da dextrana, desde que a fluorescência do próprio Tb(III) sofre esta influência. (122)

Os dados relativos a experiência estão sumarizados na Tabela 14 para os valores de comprimento de onda onde a intensificação foi máxima.

Tabela 14 - Efeito do pH na intensificação de fluorescência do Tb(III) ( $5 \times 10^{-3}$  M) em presença e ausência da dextrana (0,05M). ( $\lambda_{em} = 543$ nm).

pH	F* Tb(III)	F* Tb(III)-Dex	$\Delta F^*$ max	$\lambda^{**}$ nm
2,9	0,4	14,4	14	280
4,4	1,0	16,0	15	280
5,9	0,1	16,1	16	290
6,9	6,5	31,5	25	290

\*\*comprimento de onda onde se observa intensificação máxima.

\* unidades arbitrárias.

Pelos dados da Tabela 14, observamos que tanto o comprimento de onda onde ocorre o máximo de excitação, como a intensificação ( $\Delta F$ ) são alterados pela variação do pH, o que nos

indica que a interação entre Tb(III) e dextrana sofre influência do pH.

#### 6.2.1c. TITULAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE DEXTRANA COM Tb(III)

Tendo em vista que existe um efeito de pH na intensificação de fluorescência do Tb(III), foram realizadas titulações fluorimétricas da dextrana 0,05M com adição de TbCl<sub>3</sub> 0,2M nos pHs 3.0, 4.4 e 6.6. O comprimento de onda de excitação escolhido foi 290nm, onde a intensificação de fluorescência foi mais acentuada.

As curvas de titulação apresentadas (Figura 35) registram a fluorescência (F) do térbio (III) em presença de dextrana versus razão molar (Tb)/(Dex), onde a [ Dex ] é dada em termos de sua unidade monomérica.

Observando as curvas podemos verificar que todas elas apresentam um platô, sugerindo saturação.

Convém lembrar neste momento que ao considerarmos a intensidade de fluorescência do Tb em presença de dextrana estamos considerando não só a fluorescência do complexo como também a do íon livre. Este é o procedimento usual de representar as curvas de titulação nos casos em que a fluorescência do complexo é muito mais intensa que a fluorescência do íon livre (da ordem de  $10^3$  a  $10^5$  como é o caso de algumas proteínas. (111,113) Obviamente, nestas situações a fluorescência do íon metálico livre não iria contribuir significativamente para a fluorescência do sistema como um todo.

Na situação em que a fluorescência do metal em presença

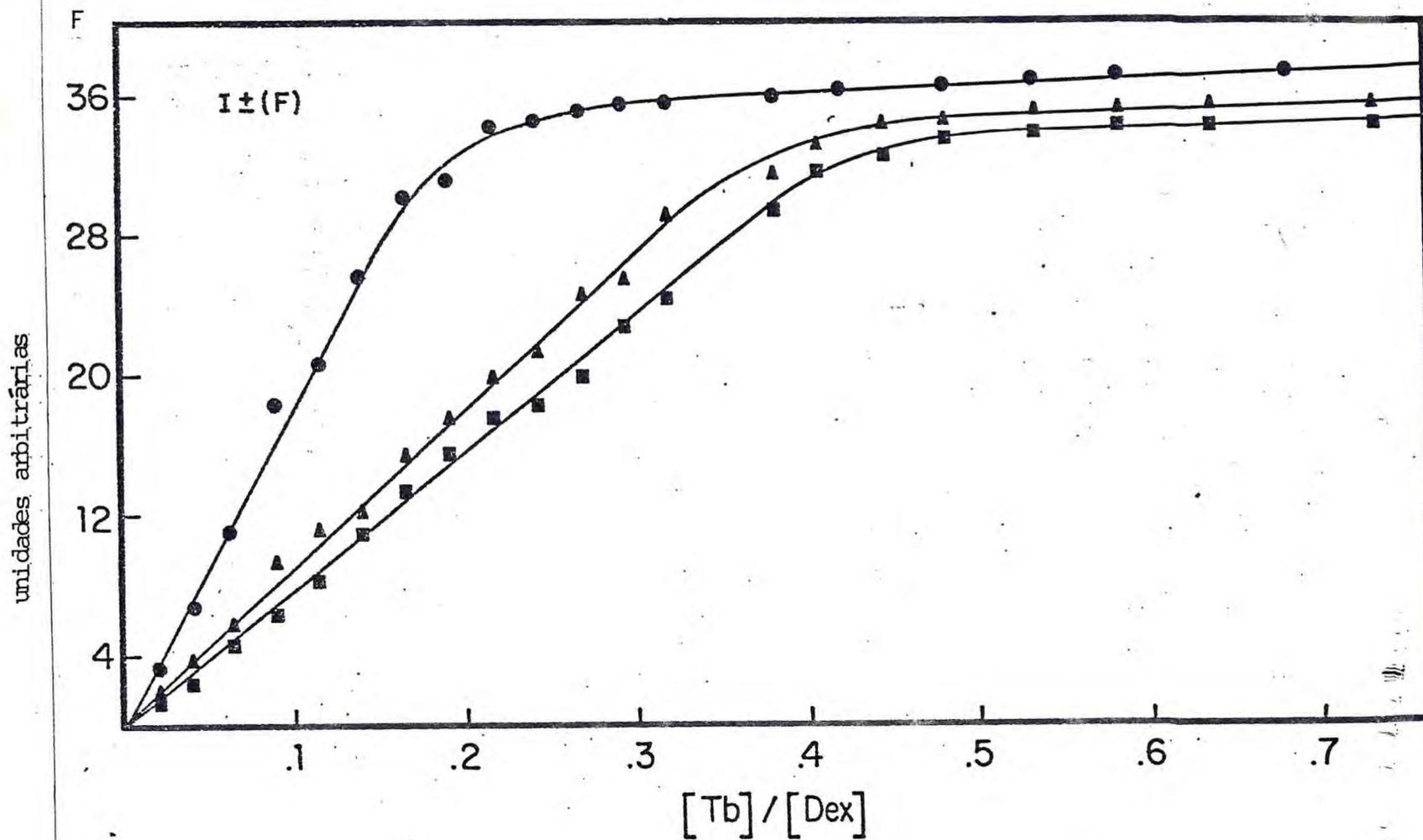


Figura 35 - Titulação fluorimétrica da dextrana 0.05M com  $TbCl_3$  0.2M nos pHs 6.6 ( ● ), 4.4 ( ▲ ) e 3.0 ( ■ ).  $\lambda_{exc} = 290nm$  e  $\lambda_{em} = 543nm$ .

do ligante não sofre grande intensificação, costuma-se representar a curva de titulação através de  $\Delta F$  (fluorescência do complexo fluorescência do íon livre) como é o caso da titulação fluorimétrica realizada por RODRIGUES e GALEMBECK<sup>(122)</sup> em seus estudos com a poliacrilamida.

Diante dos fatos, representaremos a curva de titulação fluorimétrica também do outro modo ( $\Delta F \times (Tb)/(Dex)$ ).

Geralmente o comportamento apresentado pela curva (Figura 36) sugere a formação de mais de um tipo de complexo, a exemplo do observado nos estudos fluorimétricos realizados com parvalbumina<sup>(113)</sup> e com tRNA.<sup>(123)</sup> Entretanto não podemos sugerir a mesma explicação para o nosso sistema. Nos referidos trabalhos, a concentração do íon T.R utilizada foi bastante inferior, sendo observada ainda linearidade da fluorescência do metal em função da sua concentração<sup>(124)</sup> o que não foi o nosso caso.

Observando as curvas (Figura 35 e 36) podemos concluir:

a) que o pH influencia a intensificação da fluorescência da solução de Tb(III) em presença de dextrana.

b) que todas as curvas sugerem a interação do Tb(III) com a dextrana, ou seja a formação de um complexo.

c) que a interação é favorecida com o aumento do pH.

d) que a razão molar (Tb)/(Dex) onde ocorre saturação

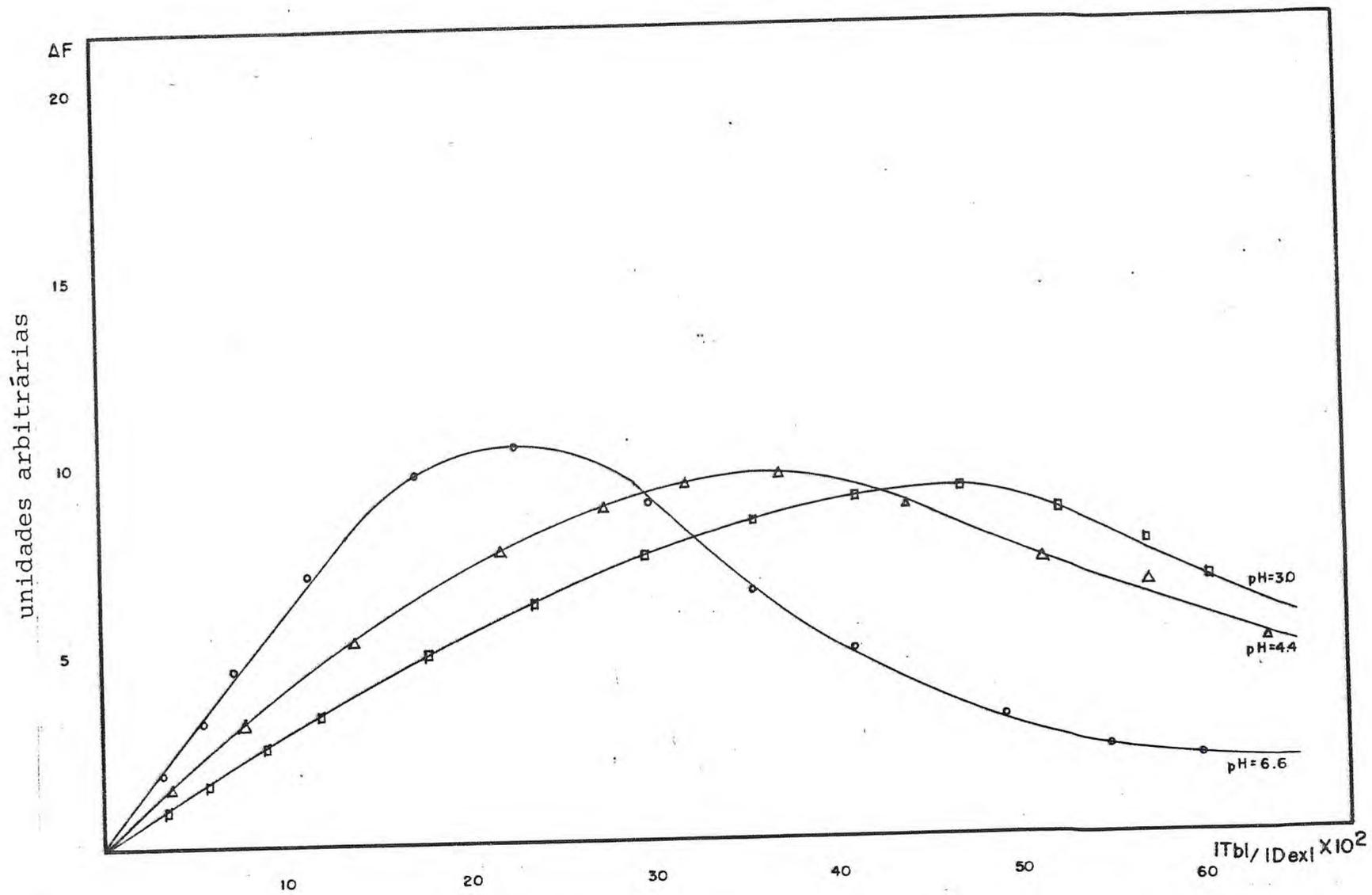


Figura 36.- Titulação fluorimétrica da dextrana 0.05M com TbCl<sub>3</sub> 0.2M nos pHs 6.6, 4.4 e 3.0.  $\lambda_{exc}$  = 290nm e  $\lambda_{em}$  = 543nm.

é  $\leq 0.20$  para o sistema a pH 6.6,  $\leq 0.38$  para o sistema a pH 4.4 e  $\leq 0.43$  para o sistema a pH 3.0.

e) que a intensificação observada é em torno de 3, a mesma ordem de grandeza encontrada nos estudos de poliacrilamidas com Tb(III).

A fim de evitar um efeito de comprimento de onda específico para as curvas de fluorescência observadas, realizamos a titulação fluorimétrica desta feita utilizando  $\lambda_{exc}$  350nm. A curva (Figura 37) mostrou comportamento semelhante a realizada com  $\lambda_{exc}$  290nm.

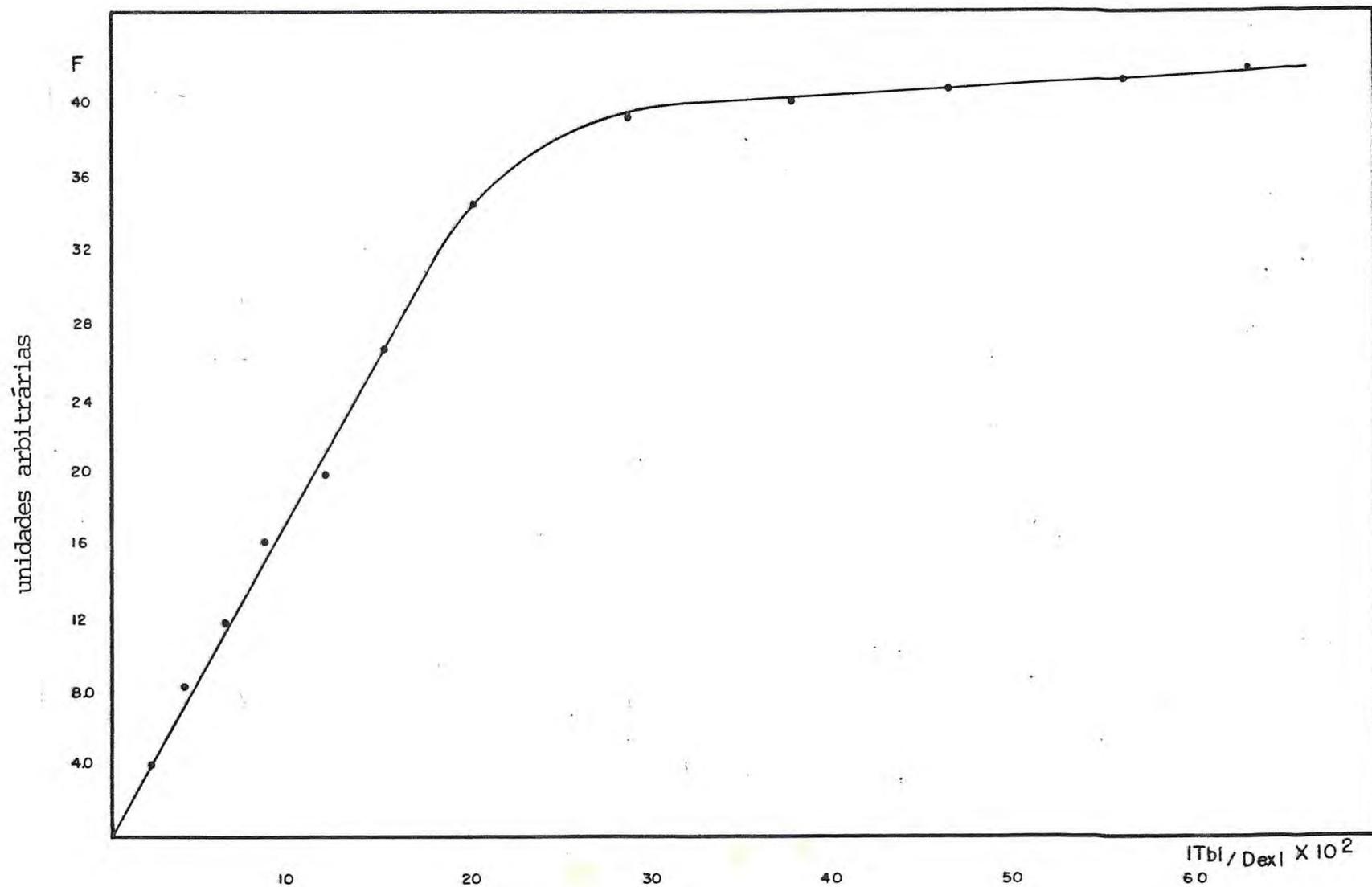


Figura 37 - Titulação fluorimétrica da dextrana 0.05M com TbCl<sub>3</sub> no pH 6.6.  $\lambda_{exc}$  = 350nm e  $\lambda_{em}$  = 543nm.

## 6.2.1d. MECANISMO DA INTENSIFICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

Uma explicação com respeito aos mecanismos de excitação de terras raras já foi bastante discutida no capítulo 4 .

A excitação do Tb(III) na solução de  $TbCl_3$  é feita pelo mecanismo de caráter intramolecular, proposto por KREHER e BUTTER. (72)

So(complexo)  $\rightarrow$  nível terra rara  $\rightarrow$  emissão e pode ser considerado como um mecanismo de excitação direta do próprio íon terra rara.

A dextrana não fluoresce na região estudada e, portanto, a excitação do Tb(III) em sua presença só poderia ser efetuada pelo mesmo mecanismo de excitação do próprio íon terra rara, a excitação direta.

Esta conclusão pode ser reforçada se compararmos o fator de intensificação do Tb(III) ligado à dextrana ( $\approx 3$ ) com outros de sistemas macromoleculares. Têrbio ligado à tripsina cujo mecanismo de excitação é intermolecular, apresenta um fator de intensificação da ordem de  $10^3$ , (111) enquanto que a ligação a poliacrilamida, (95) que é um mecanismo de excitação direta do íon T.R., provoca uma intensificação de 7 vezes, a mesma ordem de grandeza observada pelo sistema da dextrana.

Desde que não há possibilidade de transferência de energia do ligante macromolecular para o Tb(III), deve haver outra razão para o aumento na intensidade de fluorescência.

De maneira geral, a intensidade de fluorescência é muito sensível a mudanças que ocorrem no envolvimento químico do íon metálico.

No caso dos quelatos este local de envolvimento compreende os grupos ligantes, os adutos proximalmente ligados e as moléculas do solvente (no caso  $H_2O$ ) que rodeiam o íon metálico.

As moléculas de  $H_2O$  e outros possuidores de grupos O-H são supressores muito efetivos de fluorescência. Essa supressão está associada a energia vibracional O-H que fornece um excelente caminho para a desativação radiativa.<sup>(91)</sup>

O fraco acoplamento vibrônico dos estados excitados dos íons lantanídeos com os osciladores OH das moléculas de  $H_2O$  coordenadas, determina essa desativação radiativa, processo que é diretamente proporcional ao número de osciladores OH na primeira esfera de coordenação.

Esse caminho é eliminado após substituição de  $H_2O$  por  $D_2O$ , que provoca evidentemente uma intensificação de fluorescência no sistema.

O esquema para desativação radiativa para o caso de Tb(III) é mostrado na Figura 38, onde podemos ter uma idéia da posição das energias vibracionais para os osciladores O-H e O-D.  
(89)

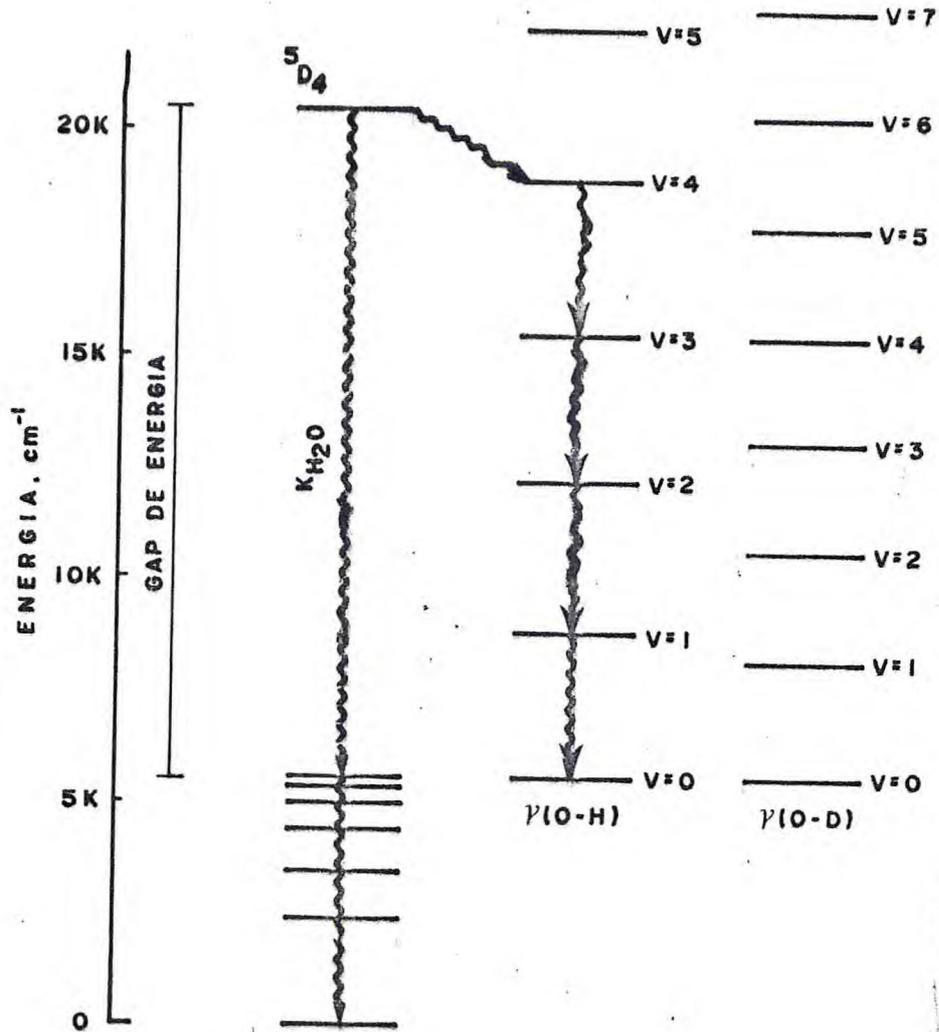


Figura 38 - Esquema de desativação radiativa do Tb(III) via vibrações O-H e posições dos níveis vibracionais dos osciladores O-H e O-D. <sup>(89)</sup>

Em solventes como metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) e acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) essa intensificação por deuteração evidentemente é menor, desde que existem menos ligações O-H no envolvimento imediato do íon metálico, que no caso da  $\text{H}_2\text{O}$ .

Este efeito de deuteração do solvente foi observado por KROOP e WINDSOR<sup>(90)</sup> e as intensidades de fluorescência ( $\text{ID}_2\text{O}/\text{IH}_2\text{O}$ ) para os sais de Tb(III) em presença de vários solventes estão na Tabela 15.

Tabela 15 - Efeito da deuteração do solvente na intensidade de fluorescência do Tb(III) em vários sais.<sup>(90)</sup>

Sal	Solvente	$\text{ID}_2\text{O}/\text{IH}_2\text{O}$	Nº $\text{H}_2\text{O}$ na primeira esfera de coordenação.
$\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$	$\text{H}_2\text{O}$	1	9,0
	$\text{D}_2\text{O}$	7,8	
	$\text{CH}_3\text{OH}$	1,8	
	$\text{CH}_3\text{OD}$	3,7	
$\text{TbCl}_3$	$\text{H}_2\text{O}$	1	9,0
	$\text{D}_2\text{O}$	8,3	
$\text{Tb}_2(\text{SO}_4)_3$	$\text{H}_2\text{O}$	1	
	$\text{D}_2\text{O}$	6,2	
$\text{Tb}(\text{EDTA})$	$\text{H}_2\text{O}$	1	2,8
	$\text{D}_2\text{O}$	5,5	

Dos resultados da tabela podemos observar que em soluções aquosas os sais de Tb(III) que mostram maiores fatores de intensificação por deuteração são os de nitrato e cloreto. Isso

é perfeitamente entendido desde que estes sais são quase que completamente dissociados em solução aquosa, ou seja a sua esfera de coordenação é composta praticamente de moléculas de  $H_2O$ .

Desde que temos concluído que a supressão de fluorescência é dependente do número das ligações O-H ao redor do íon metálico, podemos dizer então que a intensificação de fluorescência por deuteração deve ser maior quanto mais dissociado for o sal. (Essas conclusões puderam ser obtidas desde que a substituição por deutério não muda a natureza química nem a simetria do envolvimento do íon metálico).<sup>(90)</sup>

Pesquisamos este efeito, através da comparação da fluorescência do sistema Tb-dextrana em  $D_2O$  e em  $H_2O$  com o sistema  $TbCl_3$  em condições semelhantes.

Os dados relativos a experiência estão na tabela . Em adição verificamos também o efeito da intensificação da fluorescência por deuteração do solvente para outros sistemas, a fim de compararmos o grau de dissociação destes com o do nosso sistema.

Tabela 16 - Efeito da intensidade da fluorescência por deuteração do solvente. ( $[Tb(III)] = 0,02M$ )  $\lambda_{exc} = 290nm$   $\lambda_{em} = 543nm$ .

Sistema	$I_{D_2O}/I_{H_2O}$
$TbCl_3$	16
Tb- $\alpha$ metil glicosídeo (0,05M)	12
Tb-dextrana (0,05M)	11
Tb-CFN <sub>20</sub> (0,01M)	8
Tb-EDTA (0,025M)	8

Com relação ao nosso sistema Tb(III)-Dex e  $TbCl_3$  podemos verificar que o  $TbCl_3$  está mais dissociado, ou seja possui um número maior de moléculas de  $H_2O$  na sua esfera de coordenação que Tb(III) ligado a dextrana, o que comprova a participação de grupos ligantes da dextrana na esfera de coordenação primária do metal.

De acordo com o exposto acima, temos a seguinte ordem de dissociação:

$TbCl_3 > Tb-\alpha$  metil glicosídeo  $> Tb$ -dextrana  $> Tb$ -CFN<sub>20</sub>  $\geq$  Tb-EDTA.

Diante de tudo que foi discutido, podemos concluir que a intensificação de fluorescência observada para o Tb(III) ao se ligar com a dextrana é devido a substituição de algumas moléculas de (H-O-H) da esfera de coordenação do íon metálico por grupos C-OH da dextrana que são supressores menos efetivos. A fluorescência de  $Tb(NO_3)_3$  em  $CH_3OH$  é 1,8 vezes a sua fluorescência em  $H_2O$ .<sup>(90)</sup>

O efeito da complexação por substituição das moléculas de  $H_2O$  da esfera de coordenação do íon metálico já foi observado, através de estudos fluorimétrico para sistema de Tb(III)-poliacrilamidas.<sup>(95)</sup>

Outro efeito que não pode deixar de ser considerado, ao se procurar uma razão que justifique a intensificação de fluorescência do Tb(III) em presença da dextrana é a possibilidade de variação da simetria do íon pela mudança no seu envolvimento, possibilitando transições mais permitidas.

### 6.2.1e. COMPARAÇÃO COM O ANÁLOGO DE BAIXO PESO MOLECULAR

Com a finalidade de verificar o efeito da estrutura polimérica na interação Tb(III)-dextrana, analisamos o comportamento do sistema  $\alpha$ -metil glicosídeo com o térbio, através da observação das curvas de titulações fluorimétricas.

A figura 39 mostra a curva de titulação fluorimétrica do  $\alpha$  metil glicosídeo com o Tb(III). Se compararmos esta curva com aquela apresentada para a dextrana podemos observar que as duas são semelhantes, no entanto a curva do polímero é mais deslocada para a esquerda. Isso indica que ocorre maior interação do Tb(III) com o polímero do que com o seu análogo de baixo peso molecular.

DAVYDOVA e Col. (125) considera que de maneira geral a complexação de íons metálicos com monômeros é maior que para sistemas poliméricos correlatos o que certamente contraria os nossos resultados.

SMID e col. (126) entretanto, observou nas suas investigações, que a formação de complexos com polímeros macrocíclicos (ex: poliésteres) são consideravelmente maiores que para suas unidades monoméricas. Os autores consideram que este efeito é devido a interação cooperativa entre dois grupos adjacentes no polímero, que é conhecido como efeito de cadeia.

O fato da dextrana poder ter uma concentração local maior de grupos ligantes (efeito de concentração) pode ser um outro fator que contribui para maior reatividade de grupos

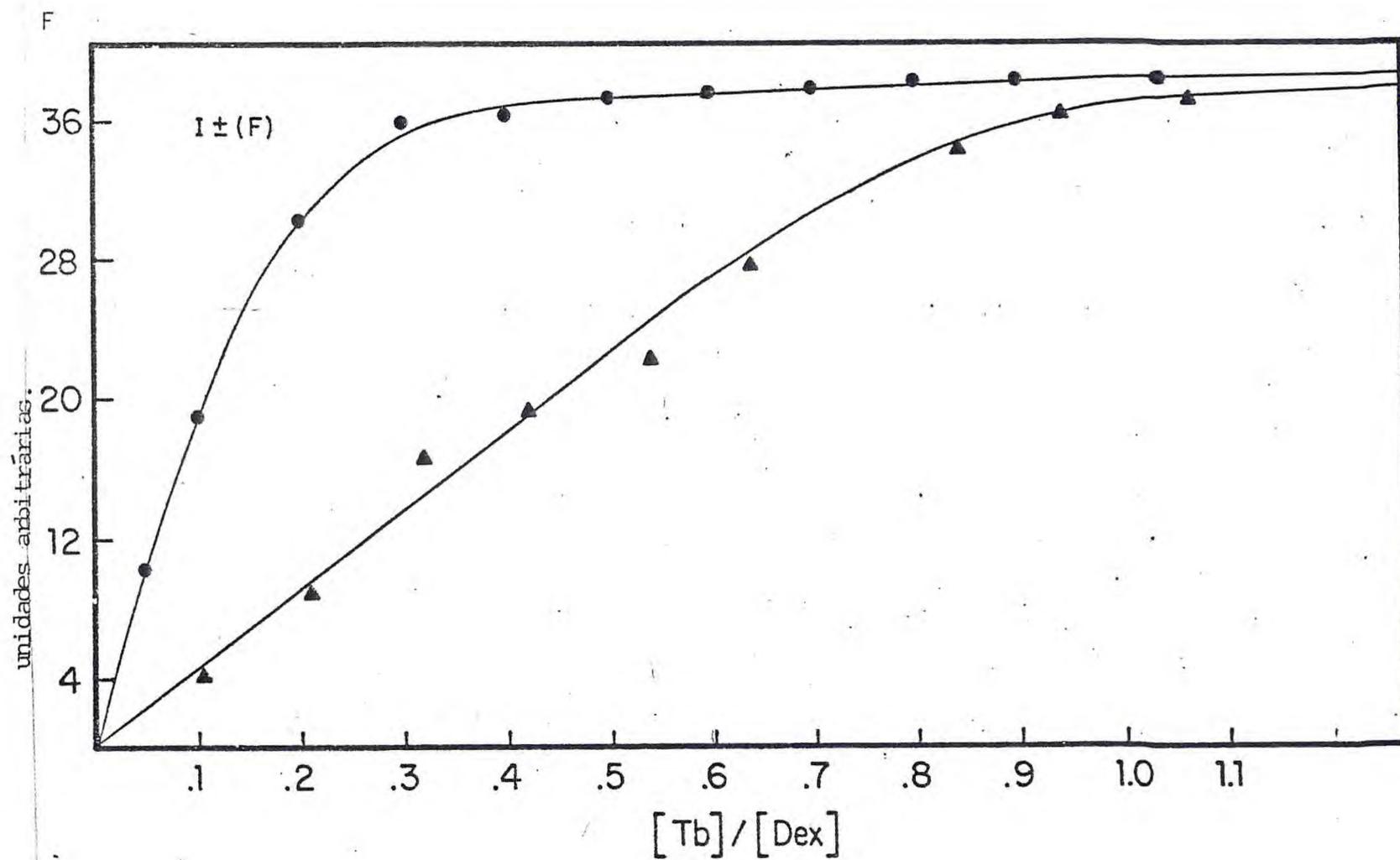


Figura 39 - Titulação fluorimétrica da dextrana 0.05M (●) e  $\alpha$  metil glicosídeo 0.05M (▲) com Tb(III) em tris (pH 6.6);  $\lambda_{exc} = 290nm$  e  $\lambda_{em} = 543nm$ .

doadores na macromolécula,

#### 6.2.1f. EFEITO DOS OUTROS ÍONS METÁLICOS NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE Tb(III)-DEXTRANA

A fim de verificar o efeito da presença de outros íons na fluorescência do complexo, adicionamos Ca(II) e Al(III) na solução da dextrana 0,05M e procedemos com a titulação usual adicionando Tb(III).

Verificamos que a intensidade de fluorescência do complexo Tb(III)-dextrana ficou reduzida com adição dos sais. Isso pode ser perfeitamente observado pelo deslocamento da curva de fluorescência com a presença dos outros íons metálicos para a direita (Figura 40).

De acordo com os resultados e desde que a presença dos íons Ca(II) e Al(III) não interferem na fluorescência do Tb(III) isoladamente, <sup>(124)</sup> podemos concluir que estes íons estariam ou ocupando o mesmo sítio de ligação do Tb(III) na dextrana ou dificultando a sua aproximação com os grupos ligantes.

As curvas apresentadas sugerem que térbio consegue deslocar tanto os íons Ca(II) como Al(III) da dextrana. A ordem de reatividade é portanto  $Tb(III) > Al(III) > Ca(II)$ , concordante com outros carboidratos. <sup>(3,9)</sup>

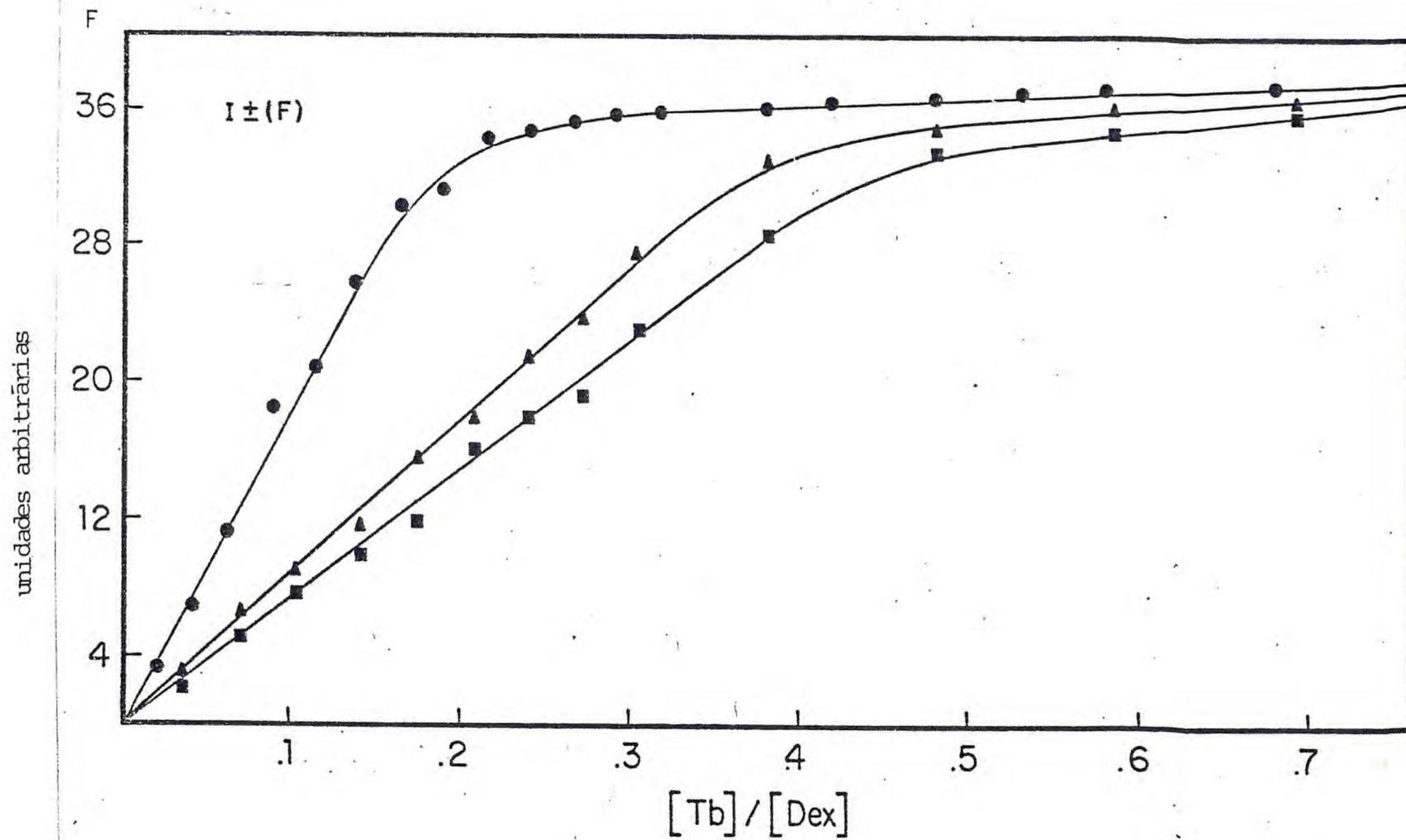


Figura 40 - Titulação fluorimétrica de dextrana 0.05M com TbCl<sub>3</sub> 0,2M na presença dos íons metálicos CaCl<sub>2</sub> 0,017M (▲), AlCl<sub>3</sub> 0,017M (■) e na ausência de íons (●).

## 6.2.2. DISPERSÃO ÓTICA ROTATÓRIA

Aspectos teóricos. (127,128)

Muitos dos compostos orgânicos, entre eles os açúcares são capazes de desviar o plano de luz polarizada. Esta atividade ótica não está ligada somente a forma cristalina, mas também pode ser originada da estrutura molecular de um composto. Este é o caso de moléculas orgânicas em solução que contenham um ou vários átomos de carbono assimétrico.

Um composto é opticamente ativo em solução se a sua estrutura não coincide com a sua imagem no espelho, ou seja, o composto não possui um plano ou um centro de simetria.

A relação abaixo define o poder rotatório específico  $[\alpha]$  como a propriedade intrínseca de uma molécula opticamente ativa.

$$[\alpha]_{\lambda}^{t^{\circ}} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

onde  $\alpha$  é o ângulo de desvio medido em graus

$t^{\circ}$  é a temperatura em graus Celsius

$\lambda$  é o comprimento de onda da luz polarizada.

$l$  é o comprimento da cela (em decímetros)

$c$  é a concentração da solução expressa em gramas por mililitro.

O poder rotatório específico molecular de uma substância é dada pela equação

$[\Phi] = \frac{[\alpha]M}{100}$ , onde  $M$  é a massa molecular da substância considerada.

A variação da atividade ótica em função do comprimento de onda é representada por uma curva de dispersão ótica rotatória (O.R.D.). Para um composto que não absorve luz na região do comprimento de onda estudado a atividade ótica diminui progressivamente a medida que o comprimento de onda aumenta e se observa neste caso uma curva de O.R.D. contínua ou normal. Para uma molécula que possui um ou mais cromóforos a curva de O.R.D. é descontínua, anormal e apresenta máximos e mínimos na região do espectro que manifesta a existência de tais cromóforos. Neste caso a curva de O.R.D. mostra um efeito conhecido como efeito Cotton.

Enquanto o efeito de dispersão de um cromóforo óticamente ativo se deve a diferença de velocidade entre os raios de luz circularmente polarizados, o chamado efeito de dicroísmo circular (C.D.) se deve ao fato de que o raio circularmente polarizado da direita absorve de modo diferente do raio circularmente polarizado da esquerda e portanto ao invés de movimento circular adquire um movimento elíptico.

Tanto dicroísmo circular (C.D.) como O.R.D. tem sido bastante úteis na determinação estrutural de compostos óticamente ativos.

Muito tem sido realizado, correlacionando a configuração de complexos óticamente ativo com o seu efeito Cotton, como é o caso do estudo do sítio de ligação nas metaloproteínas.

O.R.D. também permitiu estudar a estrutura geral das

proteínas e a configuração de áreas tais como o sítio ativo das enzimas.

Medidas de rotações moleculares tem sido muito utilizadas para determinar conformações de açúcares. Sabe-se através dessas medidas por exemplo, que  $\alpha$ D-metilxilopiranosídeo existe como um conformero  ${}^4C_1$  enquanto que  $\beta$ D-metilxilopiranosídeo existe como um conformero  ${}^1C_4$ . (18)

Com relação a polissacarídeos, como K e i - carragenana sabe-se que as suas cadeias são conhecidas por associar mudanças na rotação ótica devido a mudanças de temperatura de soluções aquosas destes polissacarídeos. Esse efeito tem sido atribuído a formação de dupla hélice. (18) Portanto mudanças nas estruturas secundárias e terciárias são perceptíveis por medidas de rotação ótica.

A formação de muitos complexos com glicosídeos, entre estes a própria dextrana foi comprovada por REEVES (45) e LUGOVAYA e col. (39) através de medidas de  $(\Delta m)$ , ou seja deslocamento molecular rotatório. Com a presença do íon metálico, se ocorre formação de complexo, o poder rotatório específico  $(\Phi)$  da molécula é alterado. O deslocamento molecular rotatório pode ser negativo, e neste caso indica a formação de complexo levorotatórios, ou positivo, indicando evidentemente a formação de complexo dextrorotatórios.

Nesta etapa utilizaremos o efeito de dispersão ótica rotatória para observar a interação Tb(III)-dextrana, será ob

servado inicialmente se ocorre uma mudança no poder rotatório específico da dextrana em presença do íon metálico.

O estudo da atividade ótica das soluções de dextrana e dextrana +Tb<sup>+3</sup> foi realizado, desde que a presença do metal provocou um  $\Delta(m)$  (deslocamento molecular rotatório) significativo. (Figura 41)

De acordo com a curva de dispersão ótica rotatória(O.R.D.) da dextrana e da DEX+Tb<sup>+3</sup> observamos que apenas um estudo na região de 280-400nm é significativo, visto que além deste comprimento de onda a presença do metal não modifica acentuadamente o ângulo de rotação da dextrana (Tabela 17).

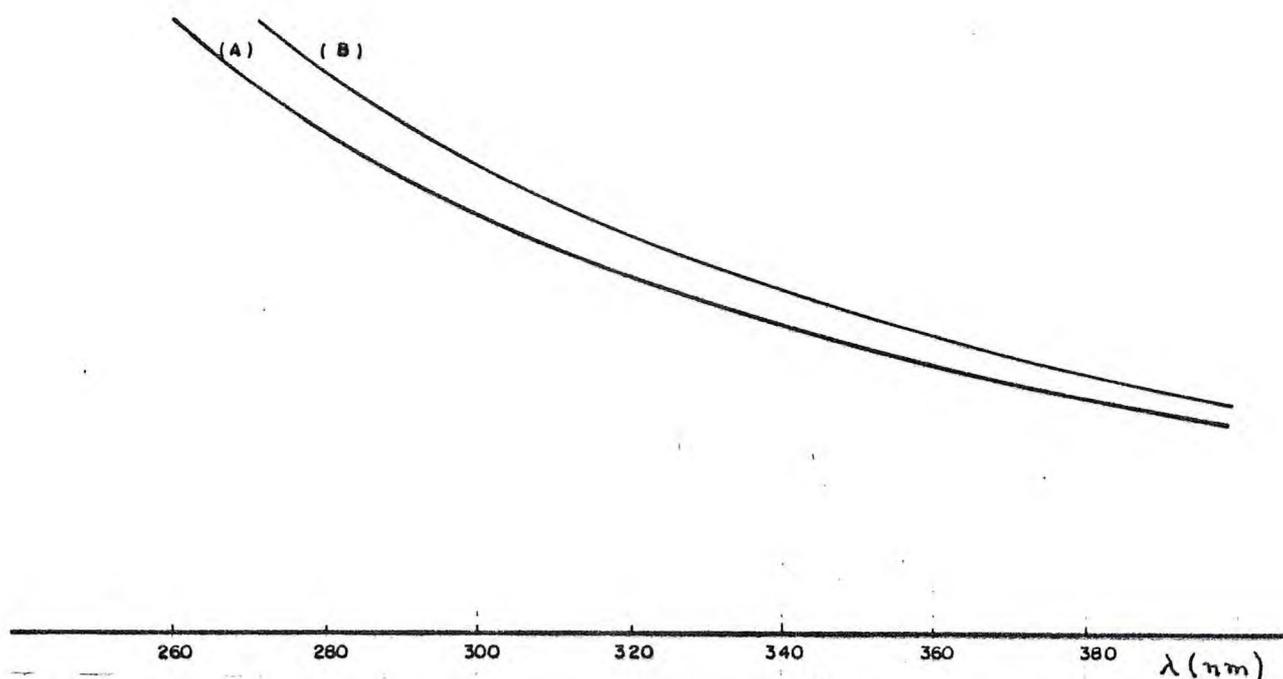


Figura 41 - Curvas de O.R.D. a) dextrana 0.05M + Tb(III) 0.02M em tris (pH 6.6), b) dextrana 0.05M em tris

Tabela 17 - Dados de O.R.D. de dextrana 0,05M + 300 $\mu$ l Tb(III)  
0,2M em tampão tris.

(a) $\lambda_{nm}$	Dextrana		Dextrana+Tb(III)		
	$\alpha^{(b)}$ (graus)	$[\alpha]^{(c)}$	$\alpha$ (graus)	$[\alpha]$	$-\Delta(m)^{(d)}$
280	1.00 $\pm$ 0.01	1.235 $\pm$ 12	0.88 $\pm$ 0.01	1.195 $\pm$ 12	65 $\pm$ 20
320	0.70 $\pm$ 0.01	864 $\pm$ 12	0.61 $\pm$ 0.01	828 $\pm$ 12	58 $\pm$ 20
360	0.52 $\pm$ 0.01	642 $\pm$ 12	0.45 $\pm$ 0.01	611 $\pm$ 12	50 $\pm$ 20
400	0.40 $\pm$ 0.01	494 $\pm$ 12	0.35 $\pm$ 0.01	475 $\pm$ 12	31 $\pm$ 20

(a) comprimento de onda observado

(b) ângulo de rotação

(c) rotação específica

(d) deslocamento molecular rotatório, calculado como  $(\{\alpha\}_{metal} + ligante - \{\alpha\}_{ligante}) \times \frac{PM}{100}$

Um deslocamento molecular rotatório foi observado para toda a faixa de comprimento de onda estudado (280-400nm) o que é uma evidência da formação do complexo, a exemplo do que foi observado por LUGOVAYA e col.<sup>(39)</sup> quando de seus estudos da interação cobre-dextrana.

De acordo com REEVES<sup>(45)</sup> em seus estudos com cupramônio' complexos os grupos hidroxilas do C-2 e C-3 ou C-3 e C-4 das unidades monoméricas podem tomar parte da formação de complexos com íons de cobre. Complexos levorotatórios são formados no primeiro caso e dextrorotatórios no segundo caso.

Considerando os estudos de SCOTT e col.<sup>(129)</sup> dextrana for

ma complexos com cobre principalmente com grupos hidroxilas do segundo e do terceiro átomos de carbono, desde em  $\Delta(m) = -99\phi$ ,

Nossos estudos de O.R.D. para o sistema Dex-Tb(III) revelam um  $\Delta m < 0$  em toda a faixa de comprimento de onda estudada indicando portanto que os grupos hidroxilas que tomam parte das ligações são os do C-2 e C-3 das unidades monoméricas.

LUGOVAYA e col. <sup>(39)</sup> em seus estudos cobre-dextrana propõem que as unidades monoméricas que tomam parte da formação do complexo sejam as unidades das cadeias ramificadas, pelo menor efeito estérico que estas apresentam. Em estudos anteriores, realizados através de  $^1\text{H}$  NMR, caracterizamos a dextrana utilizada por nós como sendo ramificada, portanto essa possibilidade também pode ser considerada por nós.

O efeito da rotação ótica da dextrana em presença de vários sais ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{AlCl}_3$ ) foram verificados e um deslocamento molecular rotatório ( $\Delta(m) < 0$ ) também foi observado, não diferindo significativamente dos valores para o Tb(III), (embora um pouco menores).

Esse comportamento também foi observado por LUGOVAYA e col. <sup>(39)</sup> com vários íons metálicos (Cu, Zn, Co e Ni). Os resultados dessa investigação, juntamente com seus estudos de pH, sugerem que a estrutura da unidade de coordenação é independente do íon metálico adicionado e indicam também que a conformação da dextrana permanece inalterada em presença de eletrólitos.

Estudos de O.R.D. também foram investigadas nas mesmas condições para o  $\alpha$  metil glicosídeo e um deslocamento molecular rotatório negativo ( $\Delta(m) < 0$ ) foi verificado.

O valor deste deslocamento foi menor que aquele observado para a dextrana.

LUGOVAYA e col. (39) associou o valor do deslocamento molecular rotatório com a intensidade da formação do complexo. Como o valor da  $\Delta(m)$  para o sistema Tb(III)-metil glicosídeo foi menor do que o observado para o sistema Tb(III)-dextrana concluímos que a interação de Tb(III) com dextrana é maior do que com  $\alpha$  metil glicosídeo.

Essas conclusões puderam ser estabelecidas desde que foi verificado que a conformação macromolecular da dextrana não é alterada em presença do íon metálico. Assim sendo, podemos acreditar que os valores de  $\Delta(m)$  são dependentes apenas da interação dos grupos doadores hidroxílicos com o metal e portanto os valores de  $\Delta(m)$  obtidos para o  $\alpha$  metil glicosídeo tem o mesmo significado que para a dextrana.

Estes resultados confirmam nossas conclusões anteriores obtidas nos estudos de fluorescência de que a interação de Tb(III) com o polissacarídeo é maior do que aquela com seu análogo de baixo peso molecular.

### 6.2.3. ESPALHAMENTO DE LUZ

Medidas de espalhamento de luz são muito utilizadas nos estudos de macromoléculas em solução. São de grande valor na determinação da forma, tamanho, interação entre partículas etc...

Para medir as intensidades de luz espalhada do nosso sistema foram realizadas titulações nefelométricas nos pHs 3.0 e 4.4.

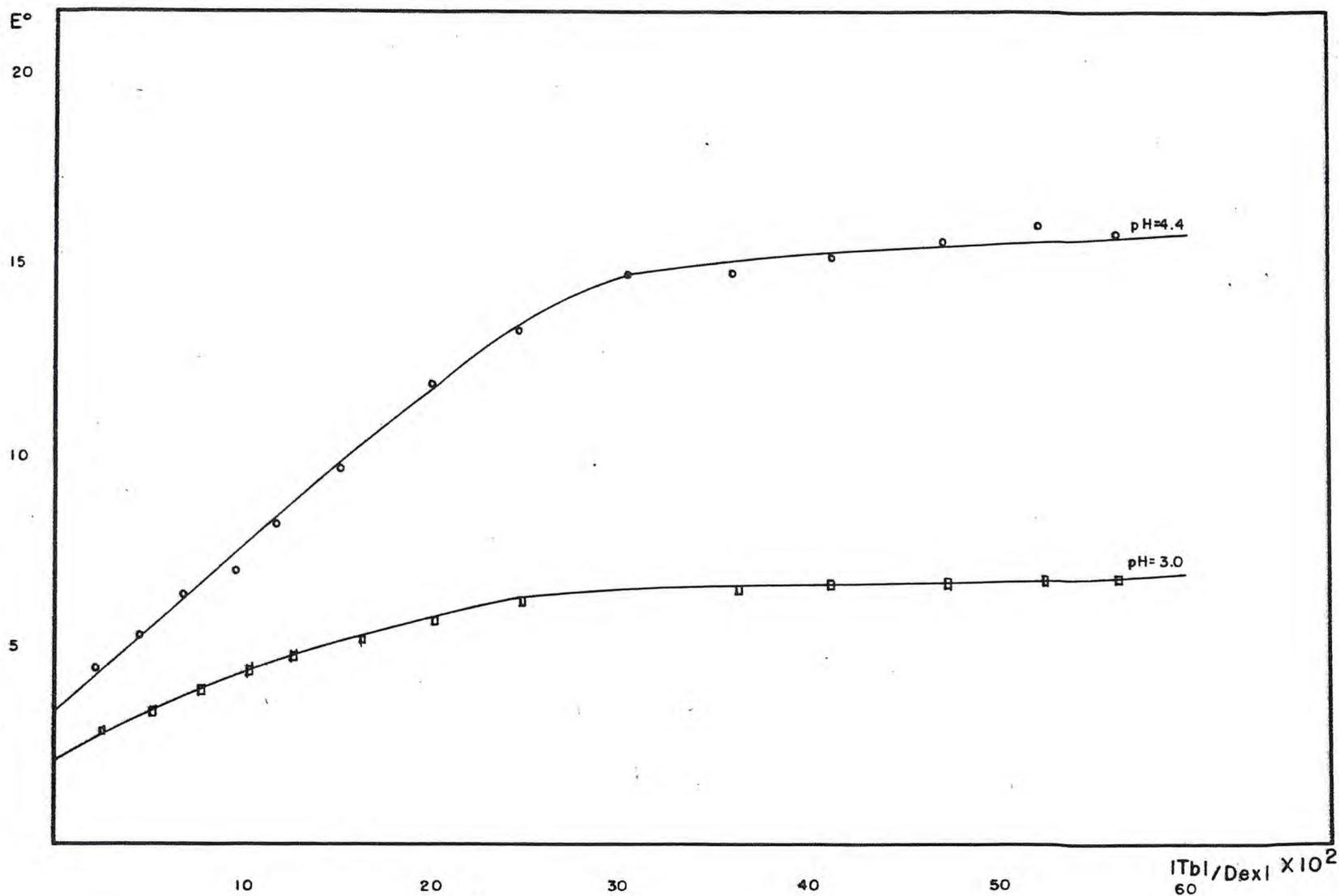


Figura 42 - Titulação nefelométrica da dextrana 0.05M com TbCl<sub>3</sub> 0.2M no pH 6.6(tris). λ<sub>em</sub> = 650nm.

A figura 42 representa os dados obtidos destas titulações e as curvas mostram as intensidades de espalhamento  $E(90^\circ)$  da solução de Tb(III)-dextrana versus relação  $\frac{[Tb(III)]}{[Dex]}$ .

Os resultados indicam a formação do complexo Tb(III) - dextrana, evidenciada pela saturação dos pontos de coordenação e caracterizada pelo platô observado no final das curvas.

Em exemplos de estudos de interações de poliacrilamidas com tório<sup>(122)</sup> este comportamento também foi atribuído a formação do complexo. Essa conclusão pode ser reforçada se discutirmos os fatores dos quais dependem a intensidade da luz espalhada.<sup>(115)</sup>

Entre estes fatores estão, a) ângulo  $\theta$  entre a luz espalhada e do feixe incidente e do  $\lambda$  da radiação b) massa molecular do soluto, c) da forma das partículas que provocam o espalhamento, d) e da diferença entre os índices de refração das partículas e do meio.

Evidentemente o item a deve ser excluído da discussão visto que o ângulo  $\theta$  e o comprimento de onda foram mantidos constantes.

Uma variação na massa molecular do soluto (dextrana) poderia ocorrer desde que a adição do metal Tb(III) possibilitaria uma interação deste com os grupos doadores da dextrana, passando a existir portanto uma outra partícula de peso molecular maior (Dextrana-Tb(III)).

A possibilidade de variação na forma molecular não po

de ser sugerida tendo em vista que os resultados obtidos através de C.R.D. indicam que não há modificação na forma estrutural do polímero, quando este interage com o metal.

Desde que uma variação no índice de refração pode estar associada com a liberação da água de hidratação<sup>(130)</sup> acreditamos que a intensificação de espalhamento possa ter sido provocada pela substituição de algumas moléculas de água da região de hidratação do polímero por interação com o metal.

Entre os fatores discutidos este talvez seja o mais conclusivo.

IKEGAMI<sup>(130)</sup> em estudos anteriores, realizados com ácido do poliacrílico, já havia demonstrado que a ligação do  $\text{La}^{3+}$  com este ácido provoca uma grande variação no índice de refração e isto ocorre devido a liberação de moléculas de água de hidratação do polímero.

#### 6.2.4. VISCOSIDADE

A viscosidade de um líquido mede a resistência interna oferecida ao movimento relativo das diferentes partes deste líquido. <sup>(115)</sup> De modo mais simplificado a viscosidade é uma medida da resistência ao escoamento.

Na maioria dos estudos em que estão envolvidas as macromoléculas, a viscosidade é um dos métodos mais empregados pois fornece informações valiosas principalmente com respeito a; forma geométrica da molécula, massa molecular média das moléculas, interações entre as cadeias das macromoléculas.

O que nos dizem respeito mais diretamente, são as informações acerca das interações destes polímeros com íons metálicos.

De um modo geral, quando se trata de um polieletrólito, as medidas de viscosidade diminuem com a adição de um sal. Isso se deve ao fato de que o cátion é retido na atmosfera iônica do copolímero por interação e com isso há uma diminuição da repulsão inter e intra cadeia. Diminuindo a repulsão há uma contração polimérica e conseqüentemente diminuição na viscosidade da solução.

A dextrana é um polímero neutro e a possibilidade de contração ou expansão da cadeia por entrada do metal pode ser bastante reduzida.

BARELOW e EBERT <sup>(53)</sup>, em seus estudos de viscosidade, tem

observado que em presença de sais, como NaCl e MgSO<sub>4</sub>, a viscosidade de intrínseca da dextrana é aumentada de 27.1 para 27.6 e 28.1 (ml/g) respectivamente. Esses aumentos, conforme os autores sugerem, são devidas a expansão das cadeias de dextrana em presença desses sais.

BIANCHI e col. (131) associaram este aumento na viscosidade de intrínseca a quantidade de sal ligada a macromolécula.

A fim de verificar alguma modificação na viscosidade da dextrana em presença de TbCl<sub>3</sub> foram realizadas as medidas de viscosidade para as soluções de dextrana e da dextrana em presença do metal.

As duas soluções foram preparadas em tampão pH 6.6 e as concentrações utilizadas foram correspondentes aquelas onde já deve ocorrer interação entre o íon metálico Tb(III) e o polímero (dextrana).

Tabela 18 - Medidas de viscosidade da dextrana e da dextrana em presença de Tb(III).

	Viscosidade específica ( $\eta$ esp)	$\eta$ esp/c (g/ml)
Dextrana 0,05M	0,20	25
Dextrana 0,05M + TbCl <sub>3</sub> 1,5.10 <sup>-2</sup> M	0,22	27

$$\eta \text{ específica} = \eta \text{ relativo} - 1$$

$$\eta \text{ relativo } (\eta_r) = \frac{\text{tempo de escoamento da solução}}{\text{tempo de escoamento do solvente}}$$

Como podemos observar a viscosidade da dextrana aumentou com a presença do íon metálico.

Esses dados estão de acordo com os observados na literatura, <sup>(53,131)</sup> mencionados a pouco.

Portanto, consideramos que o aumento na viscosidade do polissacarídeo em presença do Tb(III) deve estar assôciado a formação do complexo.

## 7. CONCLUSÃO

1. Têrbio (III) interage com dextrana em solução aquosa e a razão molar de têrbio (III) ligado a dextrana é aproximadamente 0.20, 0.38 e 0.43 para os sistemas a pHs 6.6, 4.4 e 3.0 respectivamente.

2. Um aumento no pH favorece a formação do complexo.

3. O têrbio ao se ligar a dextrana substitui parte das moléculas de  $H_2O$  da sua esfera de coordenação por grupos ligantes do polissacarídeo.

4. O têrbio (III) se liga a dextrana através dos grupos hidroxilas do C-2 e C-3 das unidades monoméricas.

5. O complexo de têrbio (III) com dextrana é mais estável do que aquele com o seu análogo de baixo peso molecular ( $\alpha$ -metil glicosídeo).

6. A ordem de reatividade para a formação do complexo com dextrana - íons metálicos é:  $Tb(III) > Al(III) > Ca(II)$ .

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHARLEY, P.J. & SALTMAN, P., *Science*, 139, 1205, 1963.
2. D. AMMANN, E. PRISTSCH & W. SIMON, *Tetrahedron Lett*, 2473, 1972. Apud KIEBOOM, A.P.G. e col. *Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 94/2, fevereiro 1975.
3. ANGYAL, S.J. *Pure appl. Chem.* 35, 131-146, 1973.
4. ANGYAL, S.J. *Aust. J. Chem.* 25, 1957-66, 1972.
5. ANGYAL, S.J., GREEVES, D. & MILLS, J.A. *Aust. J. Chem.*, 27, 1447-56, 1974.
6. ANGYAL, S.J. & DAVIES, K.P. *Chem. Commun.* 500, 1971.
7. FIEDMAN, M. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 48, 1974. Apud RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, 3, nº1, 47-79, 1978.
8. NEURATH, H., *The proteins*, V. New York Academic Press, 1970. Apud RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, 3, nº1, 47-79, 1978.
9. RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, 3, nº1, 47-79, 1978.
10. SMITH, M.C. *American Journal of Hospital Pharmacy.*, 22, 273, 1965.
11. JEANES, A. *Dextrans in Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, vol. 4, 805-824, 1973.
12. FLORAMO, A.N. 3, 022, 221, feb. 20, 1962, *Appl. Apr.* 16, 1959.
13. GOLBERG, L. & FOWLER, F. *Brit.* 895, 391, may 2, 1962. *Appl.* Aug. 5, 1959, 6pp.
14. SELYE, H., SOMOGLY, A. & MECS I. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 13, 30-36, 1968.
15. RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, Part II, 3, 1978.

16. CONN, E.E. & STUMPF, P.K. *"Manual de Bioquímica"* Trad. E.MA-LAVOLTA, D. MARTINS e SILVA e O.J. CROCOMO (Edgard Blucher, 1973).
17. LEHNINGER, A.L. *Bioquímica*. Trad. J. R. MAGALHÃES, S.C. ALFIERI, C.A. TANEZINI e D.J. MUNIZ. (Edgard Blucher, 1976).
18. STODDART, J.F. *Stereochemistry of Carbohydrates*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1970.
19. TEDDER, J.M.; NIECHUATAL, A., MURRAY, A.W.; CARNDUFF, J. *Basic Organic Chemistry*. John Wiley & Sons. New York,
20. GREEN, L.F. & WINCKLER, I. *Food chemistry* 7, 203-217, 1981.
21. PALADINI, A.C. & BURACHIK, M. *Macromoleculas*. The Pan American Union, Washington, D.C. 1968.
22. HAWORTH, W.N. *J. Chem. Soc.* 8-16, 1951.
23. SEYMOUR, F.R. & col. *Carbohydrate Research*, 53, 153-166, 1977.
24. SEYMOUR, F.R. & col. *Carbohydrate Research*, 68, 113-121, 1979.
25. COTÉ, G.L. & ROBYT, J.F. *Carbohydrate Research*, 101, 57-74, 1982.
26. SEYMOUR, E.R. & col. *Carbohydrate Research*, 51, 179-194, 1976.
27. HALL, L.D. & YALPANI, M. *Carbohydrate Research*, 91, C1-C4, 1981.
28. GAGNAIRE, D. & VIGNON, M. *Makromol. Chem.* 178, 2321-2333, 1977.

29. GLASS, C.A. *Canadian Journal of Chemistry*, 43, 2652-2659, 1965.
30. HALL, L.D. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 19, 51-93, 1964.
31. RENDLEMAN, J.A. *Adv. Carbohyd. Chem.* 21, 209, 1966.
32. BRIGGS, J. & col. *Carbohyd. Research*, 97, 181-188, 1981.
33. GRASDALEN, H. & col. *Acta Chem. Scand. B* 29, n<sup>o</sup>1, 1975.
34. KIEBOOM, A.P. G. e col. *Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 94/2, fevereiro 1975.
35. WOLFROM, M.L. *J. Org. Chem.*, 28, 281, 1963. Apud KIEBOOM, A.P.G. e col. *Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 94/2 fevereiro 1975.
36. WILLS, J.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 6, 418, 1961.
37. SALTMAN, P.D. & CHARLEY, P.J. *French Pat.* 1, 327, 727, 1963. Apud. RENDLEMAN, J.A. *Jr. Adv. Carbohyd. Chem.* 21, 209, 1966.
38. MORRIS, E.R. *Food Chemistry* 6, 15-39, 1980.
39. LUGOVAYA, Z.A., TOLMACHEV, V.N. & IL'YENKO, I.B. *Polymer Science USSR*. vol.28, n<sup>o</sup>2, 484-489, 1981.
40. MELLOR, D.P. & MALEY, L. *Nature*, 159, 370. Apud. RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, 3, n<sup>o</sup> 1, 47-79, 1978.
41. IRWING, H. & WILLIAM, R.J.P. *Journal Chem. Soc.* 3192-3210 , 1953. Apud RENDLEMAN, J.A. *Food Chemistry*, 3, n<sup>o</sup>1, 47 - 79, 1978.
42. MANKU, G.S. & CHADHA, R.C. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 34, 357-359, 1972.

43. SENTI, F.R. & WITNAUER, L.P. *Journal of Polymer Science*, 9, 115-132, 1952.
44. BARRY, J.A. & HALSEY, G.D. Jr. *J. Phys. Chem.*, 67, 1698 - 1701, 1963.
45. REEVES, R.E. *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 212-215, 1949.
46. CLUSKEY, J.E., M.S. Thesis, Bradley University, Peoria, Illinois, 1953. Apud. RENDLEMAN, J.A., *Food Chemistry*, Part II, 3, 1978.
47. SZEJTLI, J. *Acta Chim. Hung. Tomus*, 45, 1965.
48. BASEDOW, A.M. & col. *Makromol. Chem.* 180, 411-427, 1979.
49. BREMMER, I. & col. *Carbohydr. Research*, 11, 77-84, 1969.
50. LIPTAK, A. & JANOSSY, L. *Acta Biológica Debrecina*, VII-VIII, 11-16, 1969-70.
51. SLOAN, J.W. & col. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4429, 1964. Apud. SENTI, F.R. & col. *Journal of Polymer Science*, vol. VII, 327-345, 1955.
52. SENTI, F.R. & col. *Journal of Polymer Science*, vol. VII, 327-345, 1955.
53. BASEDOW, A.M. & EBERT, K.H. *Journal of Polymer Science Symposium* 66, 101-115, 1979.
54. ANTONINI, E. & col. *Biopolymers*, vol. 2, nº 1, 1964.
55. BOLETIN INFORMATION DA "PHARMACIA FINE CHEMICALS", Upplands Grafiska, Sweden, dez. 1974.
56. HENRYK, N.K. *Polymer*, 13(12) 553-554, 1968.
57. FLODIN, P. *Dextran gels and their applications in gel filtration*, Uppsala, 1962, 16p.

58. TAKAOKA, H., *Takeda Chemical Industries Ltd. Japan*, 13, 098(61) Appl. sept. 26, 1956.
59. POLUSHINA, T.V. & col. USSR. 507, 585 (Cl. CO8B) 25 mar, 1976, Appl. 2,012, 259,05 apr, 1974.
60. COX, J.S.G. & col. (*Fisons Pharm. Ltd. Holmes Chapel Engl.*) *J. Clin. Pathol.* 21(5) 611-615, 1968.
61. YUSHKO, V.K. & col. *Sint. Fiz. Khim. Polim.*, 16, 129-133, (Russ), 1975.
62. LUGOVAYA, A.I. & col. *Khim. Farm. Zh.* 10(11), 111-113, (Russ) 1976.
63. FLORAMO, N.A., US. 3,197, 458 (Cl. 260-209) july 27, 1965, Appl. Aug. 15, 1962, 3pp.
64. TOLMACHEV, V.N. & col. *Vysokomol. Soyed.* A17, nº 2, 419 - 422, (Russ), 1975.
65. TOLMACHEV, V.N. & col. *Vysokomol. Soyed.* Ser B, 17(10), 756-758, (Russ), 1975.
66. TOLMACHEV, V.N. & LUGOVAYA, Z.A. *Vysokomol. Soyed.* Ser B 18 (7) 548-549, (Russ), 1976.
67. IL'IN, A.A. *Cellul. Chem. Technol.*, 14(3) 327-328, (Russ), 1980.
68. WEISSMAN, S.I. *J. Chem. Phys.* 10, 214, 1942.
69. CROSBY, G.A. & col. *J. Phys. Chem.* '66, 2493, 1962,
70. WHAN, R.E. & CROSBY, *J. Mol. Spectry.* 8, 315, 1962.
71. BHAUMIK, M.L. & EL-SAYEL. *J. Chem. Phys.*, 42, 787, 1965.
72. KREHER, K. & BUTTER, E. *Z. Phys. Chem.* 242, 184, 1969.
73. SERRA, O.A. *Tese de Livre Docência, "Algumas Informações Estruturais de Compostos de Eu<sup>3+</sup> através do estudo de Espectros de Fluorescência"*, Instituto de Química, USP, 1976.

74. HELLER, A. & WASSERMAN, J. *Chem. Phys.*, 41, 3921, 1964.
75. VARSANY, F. & DIEKE, G. *J. Chem. Phys.*, 31, 1066, 1959.
76. DIEKE, G. & HALL, L. *J. Chem. Phys.* 27, 465, 1957.
77. NIEBOER, E. *Struct. Bond.* 22, 1, 1975.
78. JUDD, B.R. *Phys. Rev.* 127, 750, 1962.
79. OFELT, G.S. *J. Chem. Phys.*, 37, 511, 1962.
80. CARO, P. *Structure Electronique des elements de transition la ed.* (Presses Universitaires de France) 1976.
81. WYBOURNE, B.G. *Spectroscopic Properties of Rare Earths*, (Wiley Interscience, New York), 1965.
82. CARNALL, W.T. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earth*, edited by K.A. Gschneidner, Jr. and L. Eyring. North-Holland Publishing Company, 1979, pg. 171.
83. BECKER, R.S. *Theory and Interpretations of Fluorescence and Phosphorescence.* (John Wiley & Sons, Inc) 1969.
84. CROSBY, G.A. & KASHA, M. *Spectrochimica Acta*, 10, 377-382, 1958.
85. DIEKE, G.H. & CROSSWHITE, H.M. *Appl. Opt.* 2, 675, 1963.
86. GALLAGHER, P.K. *J. Chem. Phys.* 41, 3061, 1964.
87. KROPP, J.L. & WINDSOR, M.W. *J. Chem. Phys.* 39, 2769, 1963.
88. HORROCKS, W.D. Jr. & col. *The Rare Earths in Modern Science and Technology.* Edited by G.J. McCarthy on Rare Earth Conference 13th, Wheeling, 1977.
89. HORROCKS, W.D. Jr. & SUDNICK, D.R. *Journal of the American Chem. Society*, 101:2, 1979.

90. KROPP, J.L. & WINDSOR, M.W. *J. Chem. Phys.* 42, 1599, 1965.
91. SINHA, A.P.B. *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, New York e Londres, Academic Press, Inc. vol.2 1971, p. 263.
92. FILIPESCU, N. & McAVOY, N. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 28, 253, 1966. Apud SINHA, A.P.B. *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, New York e Londres, Academic Press, Inc. vol.2. 1971, p.263.
93. CHARLES, R.G. & col. *J. Chem. Phys.* 44, 1356, 1966.
94. HOLLOWAY, W.W. & KESTIGIAN, M. *J. Chem. Phys.* 47, 1826, 1967. Apud. SINHA, A.P.B. *Spectroscopy in Inorganic Chemistry*, New York e Londres, Academic Press, Inc. vol. 2, 1971, p.263.
95. RODRIGUES, J.F. Tese de Doutorado "Estudo Sobre Interação de Têrbio(III) com Poliacrilamidas. Instituto de Química, USP, 1979.
96. SUDNICK, D.R. & HORROCKS, Jr. *Biochim. Biophys. Acta*, 578 (1) 135-144, 1979.
97. JERSEY, J.D.; MORLEY, P.J. & MARTIN, R.B. *Biophys. Chem.* 13(3), 233-43, 1981.
98. BRITAIN, H.G. & col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 1013, 1976.
99. BLASSE, G. & BRIL. *Philips Technical Review*, vol.31, nº10, 303-332, 1970.
100. CARNALL, W.T. & col. *J. Chem. Phys.* 49, 4447, 1968.
101. THOMAS, K.S. & col. *J. Chem. Phys.* 38, 2180, 1963.
102. ALAKAEVA, L.A., KRAVCHENKO & POLVEKTOV, N.S. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, vol.39, nº3, 474-479, 1979.

103. COTTON, F.A. & WILKINSON. *Advanced Inorganic Chemistry*. 3ed. (Interscience Publishers, John Wiley & Sons, Inc. USA), 1972.
104. BIRNBAUM, E.R. & col. *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 5287, 1970.
105. DARNALL, D.W. & BIRNBAUM, E.R. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (23), 6484-6488, 1970.
106. BARELA, T.D. & col. *Biochemistry*, vol. 14(22), 4887, 1975.
107. KAYNE, M.S., & COHN, M. *Biochemistry* 13, 20, 4159, 1974.
108. YONUSCHOT, G. & MUSHRUSH, G.W. *Biochemistry* 14,8, 1677, 1975.
109. LUK, C.K. *Biochemistry*, vol.10, nº15, 2838-2843, 1971.
110. SHERRY, A.D. & COTTAN, G.L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 156, 665-672, 1973.
111. EPSTEIN, M., LEVITZKI, A. & REUBEN, J. *Biochemistry*, vol.13, nº 8, 1777-1782, 1974.
112. GAFNI, A., STEINBERG, I.Z. *Biochemistry*, vol.13, nº4, 880-803, 1974.
113. DONATO, H. & MARTIN, R.B. *Biochemistry*, 13, 4575-4579, 1974.
114. MIKELSEN, R.B. & WALLACH, F.H. *Biochimica et Biophysica Acta*, 363, 211-218, 1974.
115. SHAW, D.J. Trad. J.H. MAAR. *Introdução à Química dos Colóides e de superfícies* (Edgar Blucher Ltda) 1975.
116. RUCKEL, E.R. & SCHUERCH. *Biopolymers*, 5, 515-523, 1967.
117. PASIKA, W.M. & GRAGG, L.H. *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 41, 777-782, 1963.
118. BARKER, S.A. & vol. *J. Chem. Soc. London*, 171-176, 1954.

- Apud. NEMES-NANASINÉ, E. *Acta Biologica debrecina* V, 67, 1967.
119. BARKER, S.A. & col. *J. Chem. Soc. London*, 3468-3473, 1954.  
Apud NEMES-NANASINÉ, E. *Acta Biologica debrecina* V, 67, 1967.
120. NEMES- NANASINÉ, E. *Acta Biologica debrecina* V, 67, 1967.
121. HEYN, A.N.J. *Biopolymers*, vol. 13, 475-506, 1974.
122. RODRIGUES, J.F. & GALEMBECK, F. *Journal of Polymer Science*, vol.20, 1569-1579, 1982.
123. WOLFSON, J.M. & KEARNS, D.R. *Biochemistry*, vol.14, nº7, 1436, 1975.
124. FASSEL, V.A. & HEIDEL, R.H. *Analytical Chemistry* 26, 1134, 1954.
125. DAVYDOVA, S.L. & PLATE, N.A. *Coordination Chemistry Reviews*, 16, 195-225, 1975.
126. SMID, J. & col. *Macromolecules*, 4, 359, 1971.  
Apud. DAVYDOVA, S.L. & PLATE, N.A. *Coordination Chemistry Reviews*, 16, 195-225, 1975.
127. CRABBÉ, P. *Actividad Optica, Dispersion Rotatória Optica y Dicroísmo Circular en Química Orgânica*. The General Secretariat of the Organization of American States, Washington, D.C., 1974.
128. WILLARD, H.H., MERRIT, L.L. Jr. & DEAN, J.A. *Instrumental Methods of Analysis*. Litton Educational Publishing, Inc. New York, 1974.
129. SCOTT, T.A. & col. *J. Amer. Chem Soc.* 79, 1178, 1975.

130. IKEGAMI, A. *J. Polym. Sci. Part A*, 2, 907, 1964.
131. BIANCHI, E. & CONIO, G. *Journal of Physical Chemistry*,  
71(13), 4563, 1967.