ESTUDO DO TRANSPORTE PASSIVO FACILITADO DE ÁCIDO ASCÓRBICO ATRAVÉS DE MEMBRANA LÍQUIDA HIDROFÓBICA

Study of passive carried transport of ascorbic acid trough liquid membrane

Ricardo CACHICHI
Faculdade de Tecnologia César Lattes

Pedro L.O.VOLPE
Universidade Estadual de Campinas

Resumo: Neste trabalho foi realizado o estudo físico-químico do transporte do Ácido Ascórbico (composto cis-α, β diol), através de uma membrana líquida hidrofóbica (1,2-Dicloroetano) contendo como carregador o Ácido Fenilborônico. Para este estudo utilizou-se um sistema BLM (Bulk Liquid Membrane) acoplado a um circuito de fluxo contínuo. Inicialmente o processo de transporte foi difícil de ser estudado devido à rápida oxidação do Ácido Ascórbico em solução aquosa, mas esta dificuldade foi superada adicionando-se Glutationa reduzida na solução. Foi estudada a influência da concentração da fase fonte, da temperatura e do carregador no transporte do Ácido Ascórbico através da membrana hidrofóbica. Com o aumento da concentração da fase fonte foi observado um comportamento quase linear do aumento da concentração desse composto na fase de recebimento. Um aumento da temperatura também provocou um aumento na taxa de transporte. O efeito do carregador no transporte ficou nítido, porque na ausência deste nenhum transporte significativo foi observado através da membrana líquida hidrofóbica. A cinética desse transporte foi estudada em tempo real, utilizando espectrofotometria UV-Vis e os resultados foram obtidos através de Análise Multivariada (Método PLS). Foram realizados também cálculos teóricos para estimar a estabilidade relativa entre as duas estruturas moleculares que podem ser formadas na membrana hidrofóbica durante o transporte.
Palavras-Chave: transporte, membrana, carregador.

Abstract: In this work a physical chemistry of the transport of Ascorbic Acid (cis-α,β diol compound) through a hydrophobic liquid membrane (1,2-Diclhoroethane) carried by Phenylboronic acid was done by using a BLM (Bulk Liquid Membrane) connected to a continuous flow circuit. Initially the transport process was difficult to study due the fast oxidation of the Ascorbic Acid in aqueous solution. The influence of the source phase concentration, temperature and the carrier on the transport of Acid Ascorbic concentration against time was observed for this compound in the receiving phase. An increase of the transport rate was promoted by increasing the temperature. The effect of the carrier on the transport became distinct because in the absence of this molecule none significant transport through the hydrophobic membrane was observed. By using UV-Vis spectrophotometry, the kinetics of the Ascorbic Acid was studied in the real time and the results were obtained using multivariate methods (PLS). Theoretical calculations were performed to estimate the relative stability

between the two molecular structure wich can be formed in the hydrophobic membrane during the transport.
Keywords: transport, membrane, carrier.

INTRODUÇÃO

Membranas líquidas e tipos de transporte

Membranas hidrofóbicas ou filmes líquidos são encontradas em várias formas no nosso cotidiano. Uma camada de óleo na superfície da água é um exemplo típico de uma membrana líquida de fase imiscível. Em termos científicos, membranas líquidas hidrofóbicas, são constituídas de filmes líquidos responsáveis pelo transporte seletivo de gases, íons, moléculas carregadas e neutras via processos de permeação e transporte (Araki & Tsukube, 1990).

Uma nova época na aplicação de membranas líquidas hidrofóbicas começou quando Li[1]patenteou o uso de sistemas de emulsões de membranas líquidas em escala industrial destinado a separação de hidrocarbonetos. Baseado em uma diferença da taxa de transporte de massa através de uma membrana líquida, a transferência e a eficiência seletiva era notavelmente maior do que através de sistemas contendo membranas poliméricas (Araki & Tsukube, 1990).

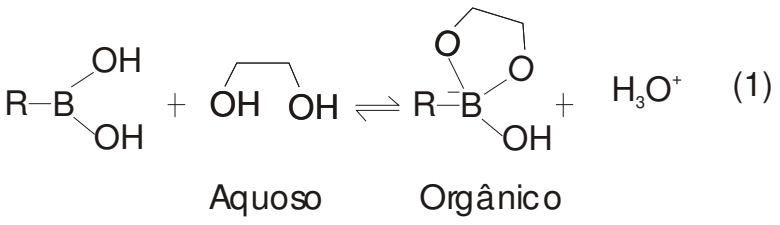
O transporte facilitado de substâncias muito solúveis em água através da membrana hidrofóbica da célula é um processo bioquímico essencial (Mahan & Escott-Stump, 1998). Existem vários tipos de transporte classificados como: difusão, difusão facilitada, transporte ativo primário e secundário, transporte passivo e transporte passivo facilitado. A difusão é o movimento do soluto a favor do gradiente de potencial eletroquímico deste, enquanto a difusão facilitada utiliza um carregador solubilizado na membrana. Já os transportes ativos primário e secundário ocorrem no sentido contrário ao potencial eletroquímico do soluto. O transporte passivo e o passivo facilitado ocorrem quando o transporte de massa é dirigido pela diferença no potencial químico das espécies de interesse entre duas fases líquidas separadas por uma membrana. O mecanismo pode envolver difusão simples ou facilitada por um

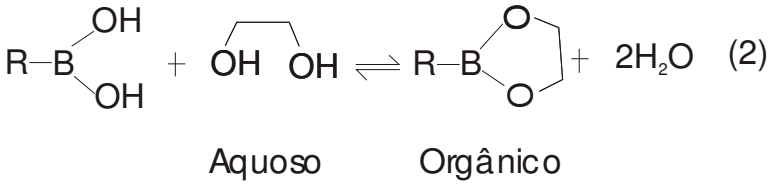
carregador. O transporte ocorre a favor do gradiente de concentração das espécies envolvidas (Araki & Tsukube, 1990).

Sistemas de transporte artificial

Enquanto importantes trabalhos têm sido realizados pelo modelo de transporte artificial de espécies iônicas através de membranas líquidas hidrofóbicas em experimentos utilizando tubo em U, poucos trabalhos têm descrito a igual relevância do transporte de substâncias neutras.

Nos sistemas naturais, o transporte de espécies químicas, iônicas ou neutras, pode ocorrer através de carregadores ligados às membranas celulares. Nos sistemas artificiais, tem sido descrita a capacidade de Ácidos Organobóricos de facilitar o transporte de compostos que apresentam grupos dióis (Sacarídeos, nucleotídeos, vitaminas, etc.) de soluções aquosas através de membranas líquidas orgânicas. Os possíveis mecanismos propostos para este transporte podem ser representados pelas equações (1) e (2):





Ácido Ascórbico

Histórico

A vitamina C é a vitamina antiescorbútica. Embora o escorbuto tenha sido primeiramente descrito durante as cruzadas e comumente infestado os primeiros exploradores e navegantes, a inter-relação específica entre o escorbuto, frutas cítricas e ácido ascórbico não foi estabelecida até o século XX. Os navegantes ingleses foram apelidados de “limeiros” desde a época em

que necessitavam carregar frutas cítricas (na verdade, limões) como preventivo do escorbuto (Mahan & Escott-Stump, 1998).

Características Químicas

O ácido ascórbico é um sólido cristalino branco, hidrossolúvel, que é estável na forma seca. É facilmente oxidável em solução, especialmente sob exposição ao calor. A oxidação pode ser acelerada pela presença de íons cobre ou ferro e por pH alcalino.

O ácido ascórbico é um derivado da hexose e classificado como um carboidrato intimamente relacionado aos monossacarídeos. As plantas e vários animais são capazes de sintetizá-la a partir da glicose e galactose. Entre os mamíferos, apenas os humanos, macacos e os porquinhos-da-índia não fabricam a vitamina C a partir de fontes intrínsecas (Mahan & Escott-Stump, 1998).

Absorção

O ácido ascórbico é facilmente absorvido a partir do intestino delgado para o sangue por um mecanismo ativo e provavelmente, também por difusão. A média de absorção é de 90% para ingestões entre 20 e 120mg; entretanto ingestões muito elevadas, as quais são freqüentemente automedicadas, a absorção é de 16% e nesses casos, os excessos são excretados como ácido ascórbico ou exalados como dióxido de carbono (Mahan & Escott-Stump, 1998).

Funções

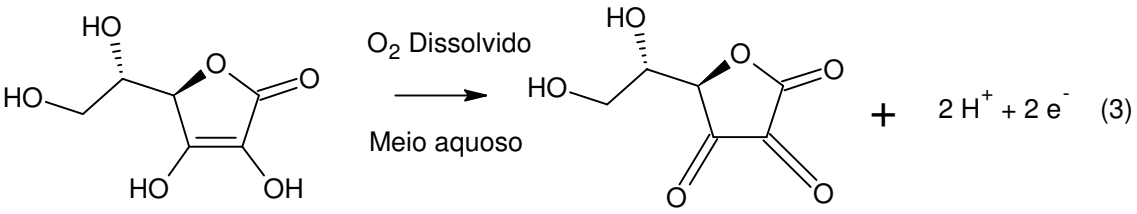
O ácido ascórbico tem múltiplas funções tanto como coenzima e cofator. Sua habilidade de perder e captar hidrogênio lhe dá um papel essencial no metabolismo. Seu papel em aumentar a absorção de ferro é bem conhecido. A vitamina C também é essencial para a hidroxilação da prolina para formar hidroxiprolina na síntese do colágeno, uma substância protéica da qual depende a integridade da estrutura celular em todos os tecidos fibrosos. Estes tecidos incluem tecido conjuntivo, cartilagem, matriz óssea, dentina, pele e

tendões. Ela está, portanto envolvida na cicatrização de feridas, fraturas, contusões, hemorragias puntiformes e sangramentos gengivais. Também reduz o risco de infecções.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estabilização do ácido ascórbico

A oxidação do Ácido Ascórbico em solução aquosa foi um dos fatores que inicialmente dificultou o monitoramento do seu transporte da fase fonte para a fase de recebimento. Foi, portanto, necessário se estudar uma maneira de estabilizar o ácido em solução aquosa, sem a qual não se teria uma confiabilidade nos resultados obtidos. A oxidação do Ácido Ascórbico é irreversível e ocorre rapidamente em solução aquosa devido à presença de oxigênio. Outros fatores que afetam a oxidação são: pH e a temperatura. A reação de oxidação pode ser descrita pela equação (3):



Ácido Ascórbico Ácido Dehidroascórbico

Para conter o processo de oxidação, utilizou-se Glutationa reduzida, que possui um elevado potencial de oxidação, maior que o do Ácido Ascórbico e que se oxida no lugar deste, mantendo o Ácido Ascórbico na forma não oxidada.

Os gráficos de Absorbância versus tempo, em comprimento de onda de 264nm (máximo do Ácido Ascórbico) de uma solução $1{,}00.10^{-4}$ $Mol.L^{-1}$ de Ácido Ascórbico sem e com Glutationa reduzida estão representados nas Figuras 1 e 2.

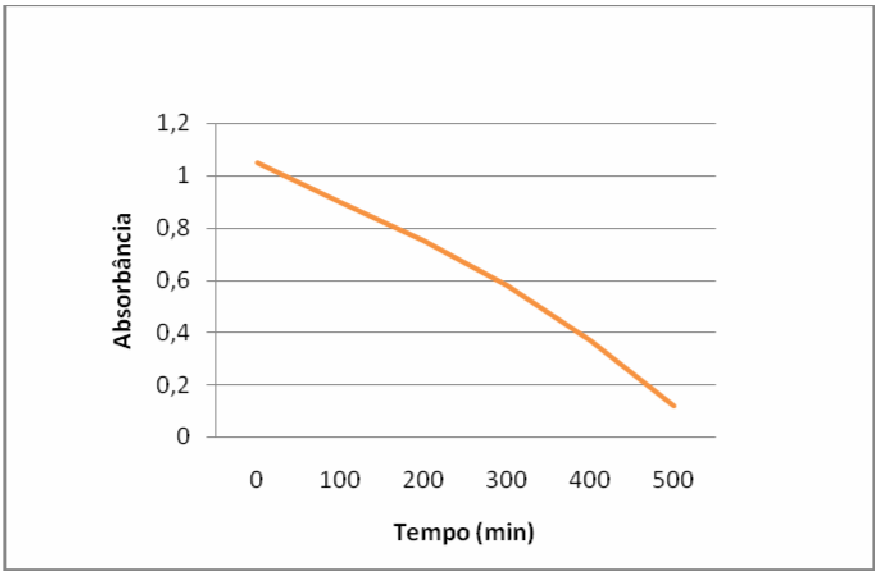


Figura 1. Cinética de Oxidação do Ácido Ascórbico em solução com concentração de $1{,}00.10^{-4}$ $Mol.L^{-1}$ a 25º C.

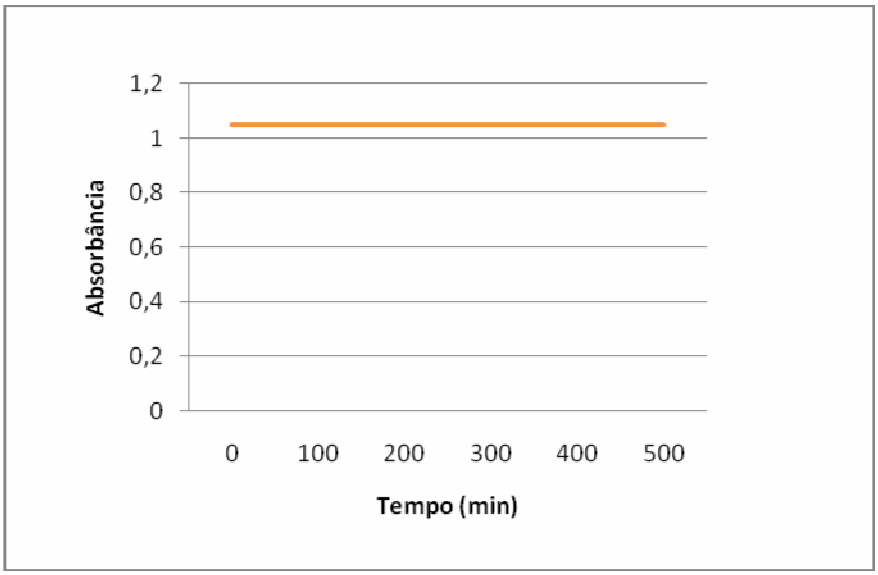


Figura 2. Cinética de Oxidação do Ácido Ascórbico em solução com concentração de $1{,}00.10^{-4}$ $Mol.L^{-1}$ a 25º C, estabilizado com Glutationa reduzida em igual concentração.

Transporte através de uma membrana líquida de 1,2 Dicloroetano utilizando Ácido Fenilborônico como carregador

O sistema utilizado para realizar o estudo cinético do transporte do Ácido Ascórbico através de uma membrana líquida de 1,3 Dicloroetano foi o sistema em U (Bulk Liquid Membrane), mostrado na Figura 3.

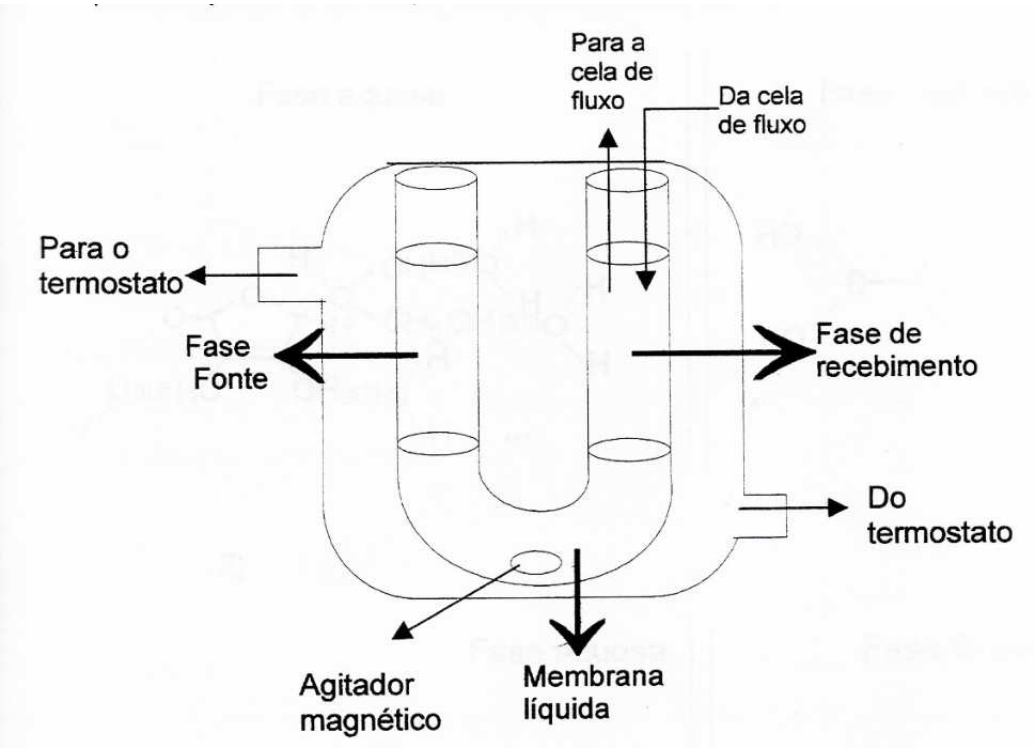


Figura 3. Sistema em U utilizado no transporte de Ácido Ascórbico através de uma membrana líquida hidrofóbica.

Nesse sistema, o Ácido Ascórbico está inicialmente presente na fase fonte (aquosa) com Glutationa (proporção molar 1:1). Esse soluto é transportado até a fase de recebimento através da membrana líquida hidrofóbica mediado por um carregador, o Ácido Fenilborônico, através do mecanismo mostrado na equação 2. O transporte de Ácido Ascórbico foi monitorado em tempo real na fase aquosa de recebimento através de um espectrofotômetro com arranjo de diodos montado num sistema de fluxo contínuo. Pela análise prévia dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se dizer que o transporte de Ácido Ascórbico pode ser classificado como um transporte passivo facilitado por um mediador (o Ácido Fenilborônico), uma vez que ocorre a favor do potencial químico das espécies de interesse, como mostrado na Figura 4.

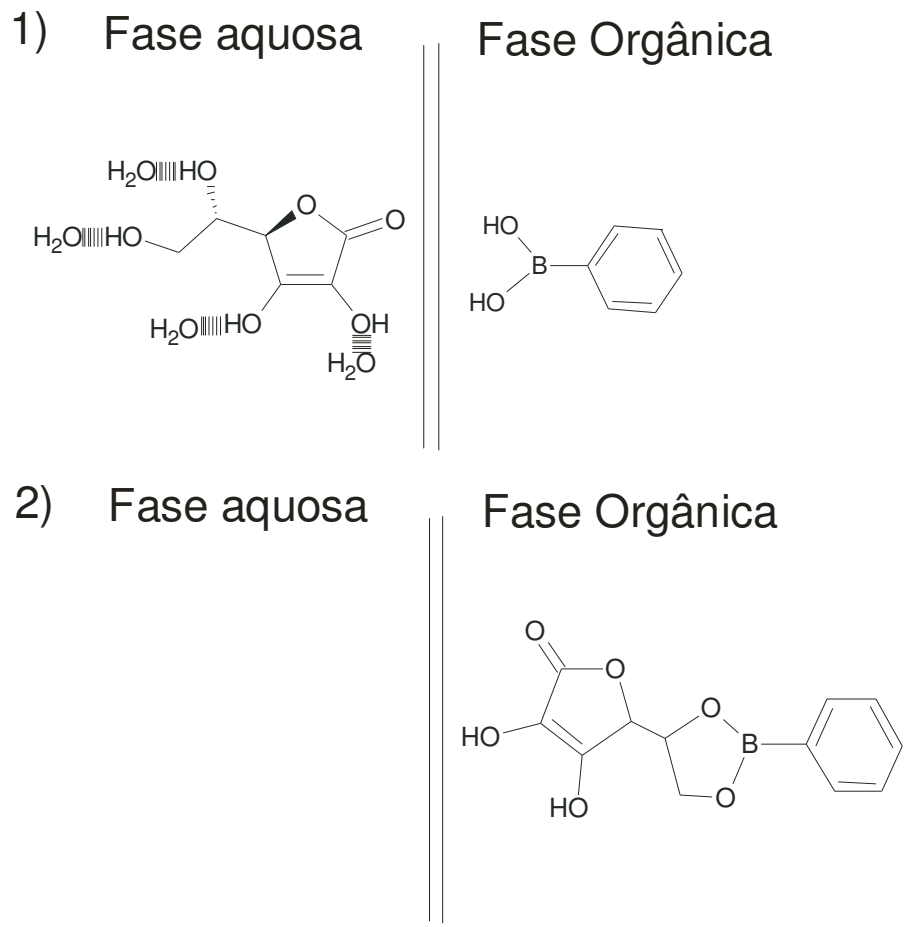


Figura 4. Potencial químico das espécies de interesse.

Já o transporte que ocorre da membrana líquida para a fase de recebimento pode ser classificado como uma difusão passiva, uma vez que ocorre a favor do gradiente de concentração como enunciado na 1ª Lei de Fick:

$$J = -D.\frac{dC}{dX}$$

Onde:

J= fluxo de difusão (Kg/m^2s)

dC/dX=Força motriz (“driving force”) para a Difusão

D=Coeficiente de difusão (m^2/s)

Sinal Negativo - Indica que a difusão ocorre da região de maior concentração para a de menor concentração.

Efeito do carregador

O efeito do carregador no transporte do Ácido Ascórbico foi inicialmente estudado da seguinte maneira: na presença e na ausência do carregador. As absorbâncias obtidas a 264nm foram tratadas através de uma análise multivariada e as curvas obtidas estão presentes na Figura 5.

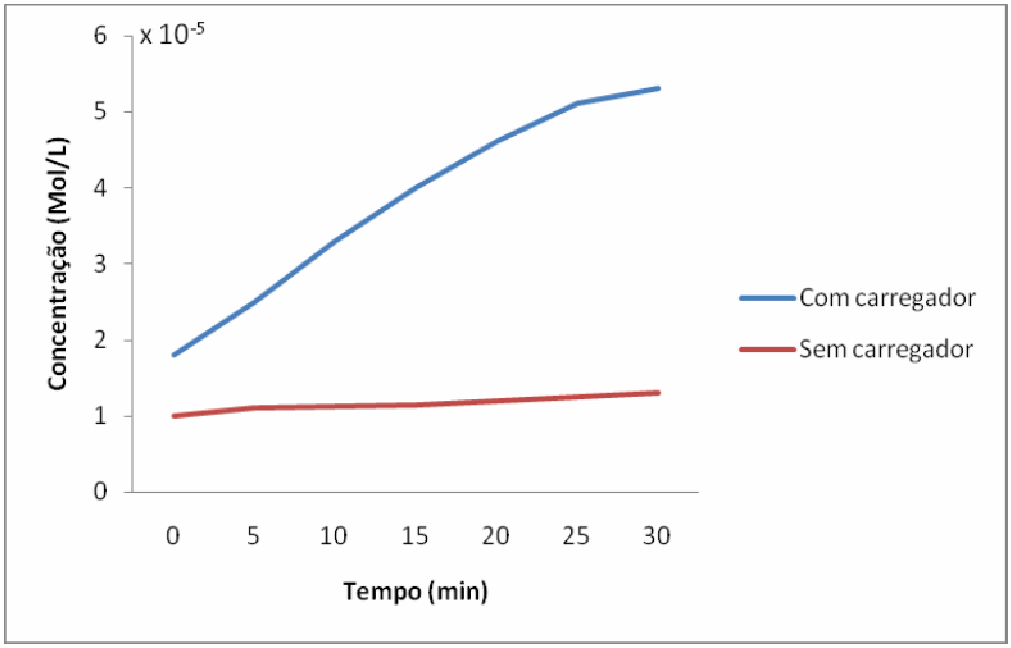


Figura 5. Efeito do carregador (Ácido Fenilborônico) no transporte de Ácido Ascórbico através da membrana líquida hidrofóbica.

Os resultados obtidos mostram nitidamente a importância do carregador no processo de transporte. O Ácido Fenilborônico possui a propriedade de complexar cis-α,β dióis formando ésteres cíclicos (equações 1 e 2). Porém percebemos uma pequena quantidade de Ácido Ascórbico sendo transportada mesmo sem a presença do carregador, o que provavelmente ocorre por difusão passiva.

Influência da Concentração da fase fonte no transporte

Variando-se a concentração da fase fonte, pode-se construir o gráfico da figura 6, a seguir, de concentração final da fase fonte versus concentração inicial da fase de recebimento, pode-se observar que existe certa linearidade

(Coeficiente de Correlação igual a 0,99544) entre as duas grandezas relacionadas.

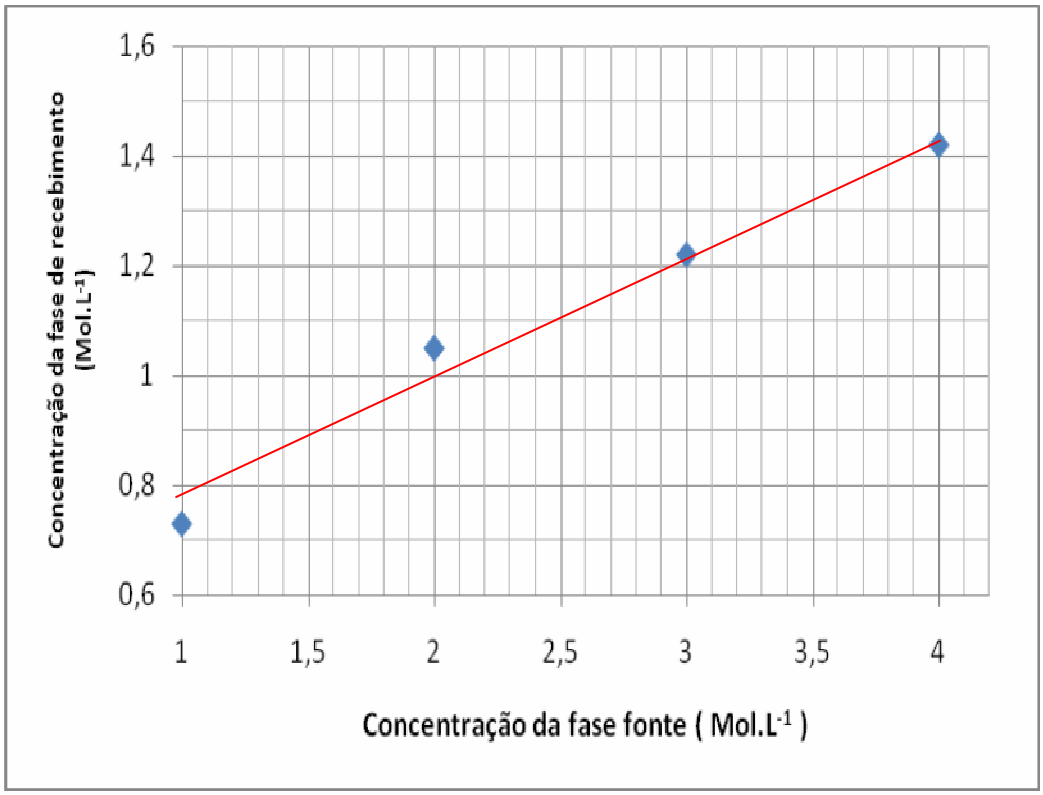


Figura 6. Relação entre a Concentração final da fase de recebimento e a Concentração inicial da fase fonte.

Influência da temperatura no transporte de Ácido Ascórbico

A temperatura também foi uma variável estudada no transporte passivo facilitado através de uma membrana líquida hidrofóbica. As taxas de transporte foram calculadas com o auxílio do software Matlab mostraram claramente a influência da temperatura neste processo, que foi de um aumento nas taxas com o aumento da temperatura, o que é coerente com a equação de Stokes-Einstein (D=kT/f), onde difusão e temperatura são diretamente proporcionais. O gráfico da taxa de transporte versus temperatura é mostrado na Figura 7.

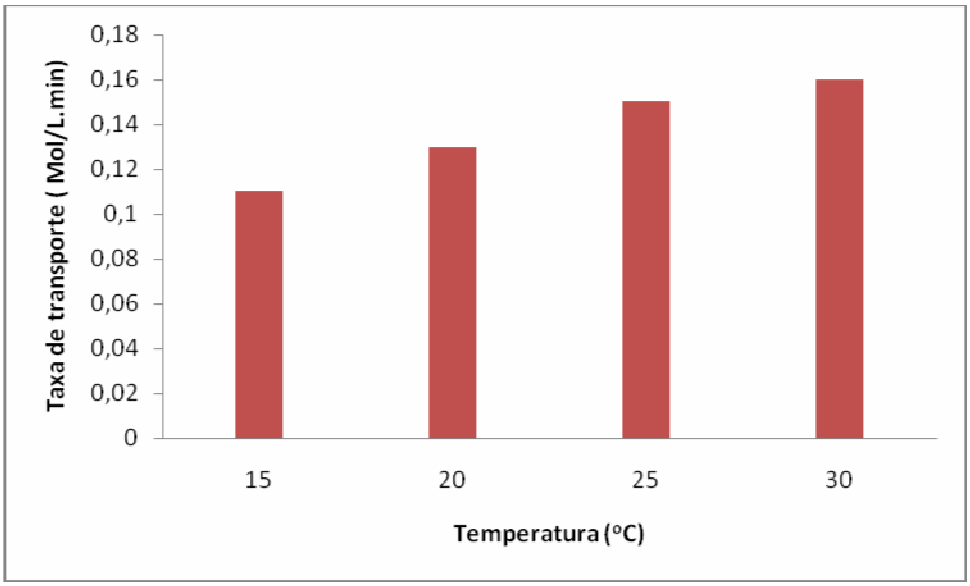
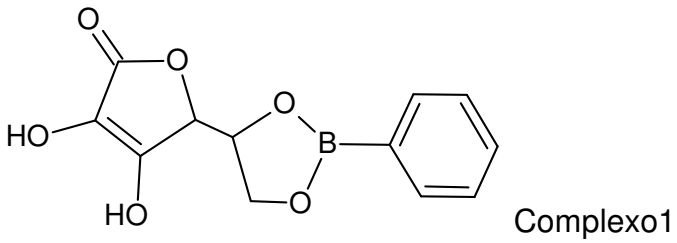


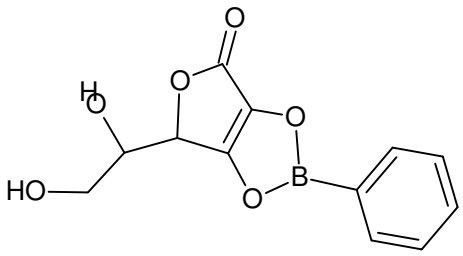
Figura 7. Influência da temperatura no transporte de ácido ascórbico através de uma membrana líquida hidrofóbica.

Cálculos de estrutura eletrônica para os complexos de Ácido Ascórbico e Ácido Fenilborônico.

Analisando-se as possibilidades de complexação entre os ácidos Ascórbico e Fenilborônico, foram sugeridas duas estruturas de complexação referentes aos dois grupos diol vicinais, mostradas nas figuras 8 e 9:



Complexo1



Complexo 2

Figura 8. Estrutura plana dos possíveis complexos formados durante o transporte do Ácido Ascórbico.

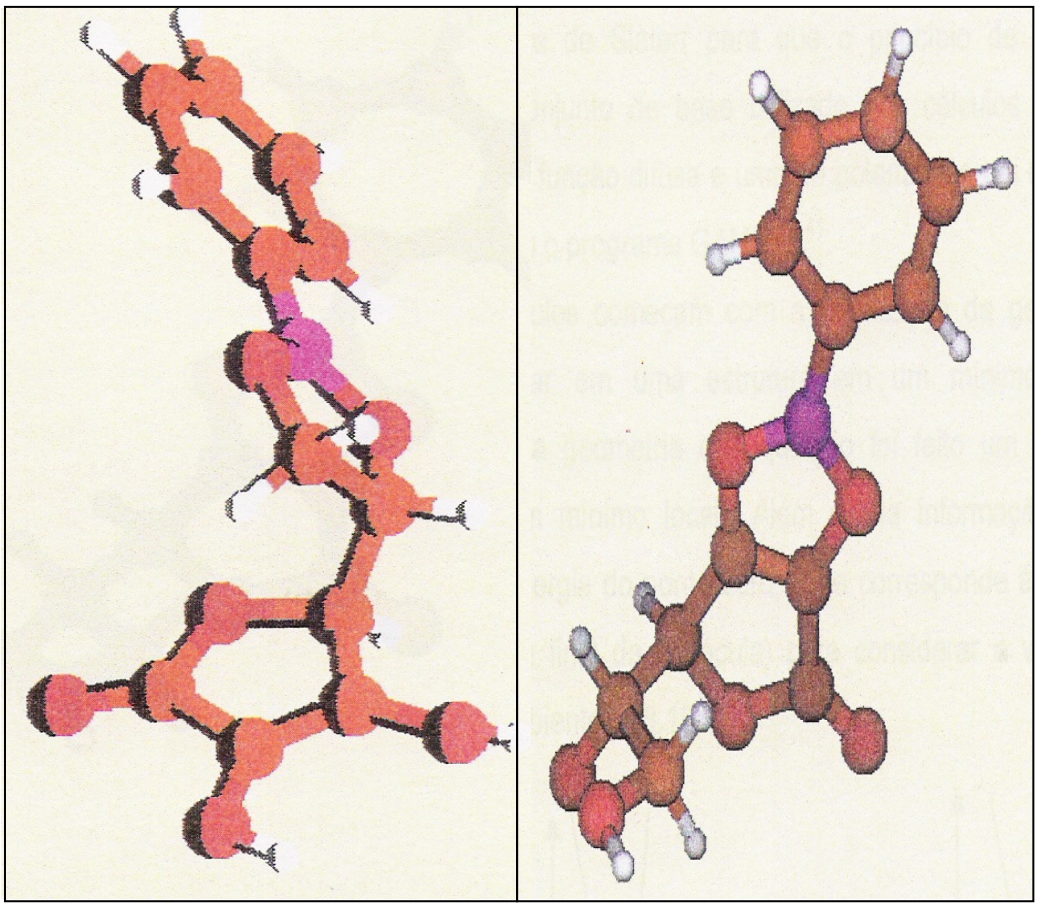


Figura 9. Possíveis estruturas tridimensionais dos complexos 1 (esquerda) e 2 (direita).

Os cálculos para determinar qual das estruturas a seguir seria a formada durante o transporte do Ácido Ascórbico foram realizados em nível Hartree-Fock (Wise & Gallagher; Martens & Naes, 1989), ou seja, assumindo que a função de onda total é obtida a partir de funções monoeletrônicas (orbitais), arranjadas em uma determinante de Slater (para que o princípio da exclusão de Pauli seja satisfeito). O conjunto de base utilizado nos cálculos é o 6-31g, ao qual foi adicionada uma função difusa e uma de polarização em cada átomo. Os cálculos foram feitos com o programa GAMESS (Szabo & Ostilind, 1996).

Os cálculos foram feitos com a otimização da geometria dos complexos (para se chegar a uma estrutura em um mínimo de energia). Após a determinação da geometria de equilíbrio foi feito um cálculo das freqüências vibracionais (um mínimo local). Além dessa informação esse cálculo permite determinar a energia do ponto zero (que corresponde à correção que deve ser feita na energia final da molécula) para considerar a vibração da molécula na

temperatura ambiente (298.15K). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Energia do Ponto zero

	E_{tot} (hartres)	E_{tot} (cal/Mol)	$E_{tot} + E_{zpe}$ (cal/Mol)
Complexo 1	-934,8078	-586600,80	-586448,31
Complexo 2	-934,7789	-586582,66	-586430,38

A partir da Tabela 1, a diferença de energia (E1-E2) foi de -18,14 cal/Mol (s/zpe) e 17,92 cal/Mol (c/zpe), onde podemos observar que muito provavelmente o composto 1 é o mais estável pois possui menor energia e apresenta uma tensão menor em sua estrutura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões deste trabalho estão listadas a seguir:

- Foi monitorada em tempo real a cinética de oxidação do Ácido Ascórbico em solução e em presença de Glutationa reduzida.
- A Glutationa na forma reduzida se mostrou eficiente na estabilização do Ácido Ascórbico em solução, uma vez que possui um potencial de oxidação maior que este último.
- O Ácido Fenilborônico permitiu o transporte do Ácido Ascórbico através de uma membrana líquida hidrofóbica.
- O monitoramento do transporte do Ácido Ascórbico em tempo real através de uma membrana líquida hidrofóbica foi possível de ser estudado devido à presença de Glutationa na fase fonte.
- Os dados de Cálculos Quânticos indicam a região da molécula de Ácido Ascórbico onde o Ácido Fenilborônico se complexa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKI, P.; TSUKUBE, H. **Liquid Membranes Chemical Aplications.** Boca raton: CRC press, 1990.

MAHAN, L.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** São Paulo: Roca, 1998.

SZABO, A.; OSTILIND, N. **Modern Quantum Chemistry.** Mineola: Dover,1996.

WISE, B.M.; GALLAGHER, N.B. **Toolbox for use with MATLAB™.**

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration.** New York: John Wiley & Sons, 1989.