

CERCETAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIOXIDANTE ALE ACIDULUI ASCORBIC ÎN PREZENȚA ACIDULUI HIALURONIC

Autori: Larisa ZADOROJNĂI*, Alexandru ZADOROJNĂI**,
Ana VEREJAN*, Svetlana HARITONOV*

*Universitatea Tehnică a Moldovei

**Universitatea de Stat din Moldova

Abstract: În această lucrare sunt cercetate proprietățile antioxidante ale acidului ascorbic în prezența acidului hialuronic, utilizând metoda spectrofotometrică de analiză, bazată pe reacțiile dintre acidul ascorbic cu ionii Fe^{3+} și reacția ionilor Fe^{2+} cu hexacianoferat (III) de potasiu. S-a evaluat schimbarea proprietăților soluțiilor cu conținut de acid ascorbic și acid hialuronic sub influența factorilor externi: timp, temperatură și concentrație.

Cuvinte cheie: acid ascorbic, vitamina C, stabilitate, Fe^{3+} , complexare, acid hialuronic, analiză spectrofotometrică, hexacianoferat (III) de potasiu.

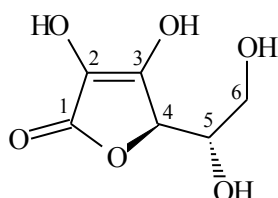
Introducere

Acidul ascorbic numit vitamina C este un acid organic cu proprietăți antioxidante, implicat în diverse procese, care se desfășoară în celulele vii.

Acidul hialuronic, datorită proprietăților sale unice, poate fi utilizat ca medicament, ca substanță farmaceutică auxiliară, ca ingredient sau compus de bază în produse cosmetice și în adaosuri alimentare, care sunt utilizate pentru întărirea sistemului imun și prevenirea diferitor maladii inclusiv a cancerului.

Scopul lucrării constă în cercetarea proprietăților antioxidante ale acidului ascorbic sub influența factorilor externi în prezența acidului hialuronic.

Caracteristica acidului ascorbic. Acidul ascorbic sau γ -lactona acidului 2,3-dehidro-L-gulonic este



Acidul ascorbic

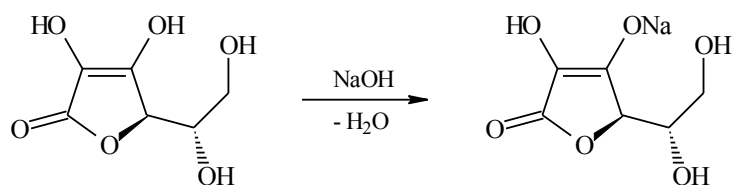
cristalin, de culoare albă, solubil în apă, fără miros, cu gust acriu. Punctul de topire este $+191^{\circ}C$, iar temperatura de descompunere $+192^{\circ}C$. Densitatea $1,65 (25^{\circ}C) g/cm^3$. Solubilitatea la $20^{\circ}C$ constituie $33,3 g/100g H_2O$ și $4,8 g/100g C_2H_5OH$. Solubil în acetonă, puțin solubil în glicerol, insolubil în benzen, dietileter, clorofom. Soluția apoasă a acidului ascorbic are pH 3. Reprezintă un reducător puternic care se oxidează cu o mulțime de oxidanți [1].

Vitamina C prezintă o importanță deosebită pentru organismul viu:

- intervine în fenomenele de oxido-reducere, fiind cel mai puternic antioxidant;
- este antiinfecțioasă, tonifiantă, antitoxică;
- participă la asimilarea de către organism a fierului;
- previne și vindecă scorbutul;
- mărește rezistența vaselor sanguine.

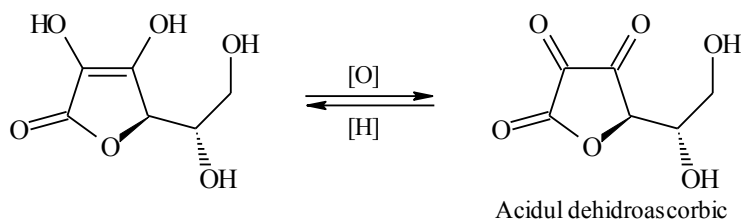
În organismul uman vitamina C deține un rol complex și important; protejează compușii biologici activi de degradări oxidative, întărește sistemul imunitar, stimulează procesele de biosinteză a colagenului, hormonilor steroidici și a unor neurotransmițători. Doza de $10 mg/zi$ previne avitaminoza C, însă rația zilnică recomandată pentru un adult este de $60 mg$. Lipsa vitaminei C din organism conduce la scorbut, denumită și boala marinarilor, caracterizată prin gingivite (gingii cavernoase și inflamate), paradontoze, pierderea dinților, vase de sânge fragile, neelastice, inflamarea articulațiilor și anemie.

Acidul ascorbic reprezintă un acid monobazic. El manifestă caracter acid datorită hidrogenului de la grupa hidroxi din poziția C_3 , la care și formează săruri:



Proprietățile chimice și fiziologice se manifestă datorită prezenței grupării endiolice. Procesul de oxidare a acidului ascorbic decurge în două etape.

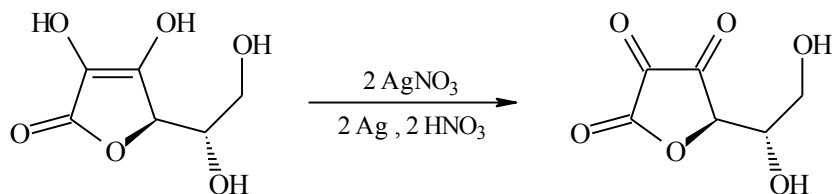
Etapa I. Este un proces de oxidare reversibil, în urma căruia acidul ascorbic se oxidează până la acidul dehidroascorbic (γ -lactona acidului 2,3-diceto-L-gulonic), care la rândul său se reduce la acid ascorbic:



Etapa II. În soluții apoase procesul de oxidare a acidului dehidroascorbic poate decurge mai departe până la descompunerea lui. În acest caz procesul de oxidare devine ireversibil și duce la pierderea proprietăților fiziologice ale acidului ascorbic.

Pentru ca preparatele farmaceutice și cosmetice pe bază de acid ascorbic să fie stabile la ele se adaugă diferiți stabilizatori.

Verificarea valabilității acidului ascorbic din preparate se efectuează prin introducerea lui în sisteme de oxido-reducere. De exemplu, interacțiunea cu nitratul de argint, duce la formarea sedimentului negru de argint metallic:



Este important ca preparatele pe bază de acid ascorbic să fie stabile și să-și manifeste proprietățile farmaceutice la nivelul necesar [2].

Caracteristica acidului hialuronic. Acidul hialuronic reprezintă un biopolimer natural, molecula căruia constă din resturile acidului β -glucuronic și N-acetil- β -D-glucozaminei unite prin legăturile glicozidice $\beta(1\rightarrow3)$ și $\beta(1\rightarrow4)$, în lanțuri lungi neramificate (Fig.1.):

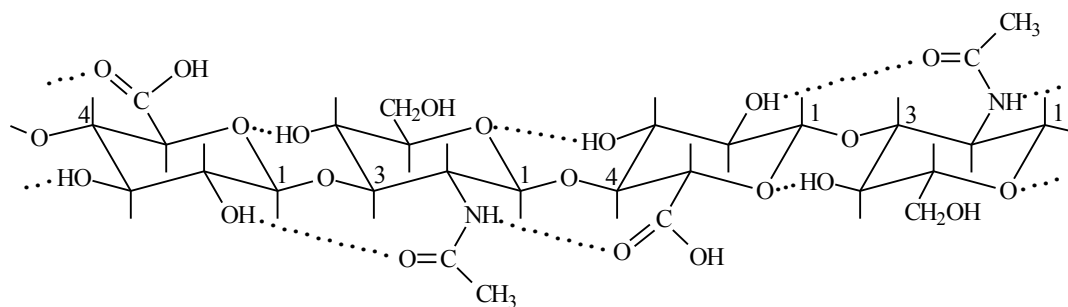


Fig.1. Structura macromoleculii de acid hialuronic

Acidul hialuronic se obține din mai multe surse de materie primă: cordon ombilical, lichid sinovial, piele, creastă de cocoși și găini, corp vitros bovin etc.

Masa moleculară a acidului hialuronic izolat din diverse surse variază și este cuprinsă între $7,7 \cdot 10^4$ – $28 \cdot 10^6$ D. Preparatele de acid hialuronic conțin diferite cantități de proteină asociată, care variază în limite largi de la 0 la 38%. Acidul hialuronic cu masa moleculară mică, are macromolecula în formă de bastonaș, cu o lungime ce variază între 250-1000 Å. Macromoleculele mai mari au o formă de spirală dezordonată, cu raza de girație de 540-4540 Å. Cu cât este mai mare masa moleculară, cu atât asimetria moleculei și vâscozitatea soluțiilor crește.

Structura chimică și spațială a macromoleculei, masa moleculară mare, vâscozitatea înaltă a soluției, elasticitatea, hidrofilia, determină calitățile biologice importante ale acidului hialuronic.

Grație acestor calități acidul hialuronic are diverse funcții biologice așa ca:

- participarea la procesele de embriogeneză și morfogeneză;
- rezistența mecanică a țesuturilor;
- relațiile și comunicarea intercelulară;
- transportul și metabolismul substanțelor;
- reținerea apei;
- micșorarea forței de frecare în sistemele biomecanice;
- formarea și menținerea structurilor transparente ale ochiului;
- permeabilitatea membranelor biologice inclusiv și a pereților vasculari.
- formarea și funcția cartilajelor [3-5].

Cercetarea activității biologice a demonstrat lipsa proprietăților toxice, iritante, alergogene, pirogene, flogogene etc. În cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie s-a efectuat un studiu comparativ al inofensivității și biocompatibilității acidului hialuronic, obținut din trei surse naturale: cordon ombilical, creastă de cocoși și corp vitros bovin [6, 7].

Acidul hialuronic și-a găsit utilizare nu numai ca medicament, dar și în calitate de substanță farmaceutică auxiliară. Datorită masei moleculare mare și proprietăților hidrofiele acidul hialuronic devine un vehicul de medicamente, care reține absorbția acestora la aplicarea topică. În asociație cu alte medicamente, acidul hialuronic formează un depozit cu eliminarea lentă și dirijată a acestora [8-10].

Materiale și metode.

Pentru determinarea concentrației acidului ascorbic s-a utilizat metoda spectrofotometrică de analiză descrisă în patentul [11]. Aceasta metoda se bazează pe reducerea ionilor Fe^{3+} cu acid ascorbic până la Fe^{2+} și interacțiunea echivalentă a Fe^{2+} cu $K_3[Fe(CN)_6]$. Analiza se bazează pe legea de bază a absorbției luminii (Bauguer-Lambert-Beer). Spectrul de absorbție s-a înregistrat la spectrofotometru CF-46. Din spectru s-a stabilit că absorbanta este maximă în domeniul 670-700 nm. Toate soluțiile au fost preparate cu apă distilată, fiartă și apoi răcită la temperatura camerei, pentru a înlătura oxigenul dizolvat.

Determinarea curbei de calibrare în metoda spectrofotometrică de cercetare. Curba de calibrare s-a construit după măsurarea absorbantei soluțiilor standarde de acid ascorbic preparate. Pentru analiză s-au pipetat în balonul cotelat de 100 ml câte 5 ml soluție acid ascorbic, s-a adăugat în fiecare 10 ml soluție 0,01N HCl, apoi s-au adăugat cu pipeta Mohr câte 5 ml soluție $FeCl_3$ 0,01 mol/l și 5 ml soluție 0,01 mol/l $K_3[Fe(CN)_6]$. Soluția de comparare s-a preparat analogic în balon cotelat de 100 ml, unde în loc de acid ascorbic s-a pipetat 5 ml apă distilată preventiv fiartă apoi răcită.

Prepararea soluției de acid hialuronic. Pentru analiză s-a preparat o soluție de acid hialuronic de 0,2% m/v, în felul următor: în balonul cotelat de 500 ml s-a cântărit exact 1,000 g acid hialuronic uscat, mărunțit, apoi s-a adăugat apă și s-a agitat până la dizolvarea completă a acidului hialuronic, care a durat 24 ore.

Prepararea soluțiilor de acid ascorbic. Pentru analiză s-au pregătit 4 soluții standarde de acid ascorbic de următoarele concentrații (probele martor):

1. $3,1 \cdot 10^{-4}$ % acid ascorbic.
2. $6,2 \cdot 10^{-4}$ % acid ascorbic.
3. $12,5 \cdot 10^{-4}$ % acid ascorbic.
4. $25 \cdot 10^{-4}$ % acid ascorbic.

C_{AA}	Absorbanța 670 nm
$3,1 \cdot 10^{-4}$	0,09
$6,2 \cdot 10^{-4}$	0,16
$12,5 \cdot 10^{-4}$	0,30
$25 \cdot 10^{-4}$	0,59

S-au pregătit încă 4 soluții standarde de acid ascorbic cu concentrațiile date, care suplimentar conțin 2% acid hialuronic.

Pentru fiecare soluție de analizat s-au pregătit soluțiile de comparare, în care s-a adăugat, respectiv, apă distilată în locul soluției de acid ascorbic.

Cercetarea stabilității soluției de acid ascorbic în timp.

Pentru a cerceta stabilitatea acidului ascorbic în soluție, în prezența acidului hialuronic în timp de 2, 8, și 24 ore, s-au pregătit trei seturi de soluții cu concentrațiile nominalizate de acid ascorbic și acid ascorbic cu acid hialuronic. Probele pregătite au fost analizate la temperatura camerei, 20°C. După timpul indicat la fiecare probă s-au adăugat reagenții corespunzători, în aceeași ordine; 5 ml soluție FeCl₃ 0,01 mol/l și 5 ml soluție 0,01 mol/l K₃[Fe(CN)₆] și s-a adus la cotă cu apă distilată preventiv fiartă și răcită la temperatura camerei. Toate soluțiile s-au fotometrat la 670 nm.

Absorbanța soluțiilor cercetate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. Cercetarea stabilității acidului ascorbic (AA), în prezența acidului hialuronic (AH), în timp, la t°=20°C.

C _{AA}	AA, 2 ore	AA+AH, 2 ore	AA, 8 ore	AA+AH, 8 ore	AA, 24 ore	AA+AH, 24 ore
3,1 · 10 ⁻⁴ %	0,12	0	0,11	0	0,09	0
6,2 · 10 ⁻⁴ %	0,17	0,05	0,17	0,08	0,16	0,09
12,5 · 10 ⁻⁴ %	0,31	0,10	0,30	0,12	0,28	0,15
25 · 10 ⁻⁴ %	0,61	0,15	0,60	0,20	0,59	0,35

Cercetarea stabilității acidului ascorbic în funcție de temperatură la diferite concentrații de acid hialuronic. Pentru cercetare s-au pregătit 4 soluții de acid hialuronic în volum de 100 ml fiecare prin metoda de diluție de următoarele concentrații:

2 · 10⁻¹ %; 2 · 10⁻² %; 2 · 10⁻³ %; 2 · 10⁻⁴ %; 2 · 10⁻⁵ %;

S-a pregătit 500 ml soluție acid ascorbic de 12,5 · 10⁻⁴ %.

În 4 baloane cotate de 50 ml s-au adăugat câte 10 ml soluție de acid ascorbic de concentrația 12,5 · 10⁻⁴ % în fiecare. În fiecare balon s-a adăugat câte 20 ml soluție de acid hialuronic de 0,2 %.

Probele cercetate s-au lăsat pentru un timp anumit (8 ore) la temperatura corespunzătoare indicată în Tabelul 2. După 8 ore probele s-au adus la temperatura camerei (25°C) și în fiecare din ele s-au adăugat reagenții corespunzători: 5 ml soluție FeCl₃ 0,01 mol/l, 5 ml HCl 0,01N, 5 ml soluție 0,01 mol/l K₃[Fe(CN)₆] și cu apă distilată s-a adus la cotă fiecare soluție. Soluțiile de comparare s-a preparat astfel: în balonul cotate de 50 ml s-a adăugat 10 ml H₂O, 20 ml soluție acid hialuronic 0,2% și s-au lăsat împreună cu soluțiile cercetate 8 ore la temperatura corespunzătoare. Soluțiile sau răcit apoi s-au adăugat reagenții și conținutul baloanelor cotate s-a adus la cotă cu apă distilată fiartă și răcită, apoi s-au fotometrat. S-a măsurat absorbanța la 670 nm. Datele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.

În același mod s-au mai pregătit 4 seturi de soluții cu diferite concentrații de acid hialuronic: 0,02%; 0,002%; 0,00002% și soluțiile lor, corespunzătoare, de comparare. Soluțiile preparate au fost tratate analogic primului set de soluții cu acid hialuronic de 0,2%. Măsurările efectuate au fost înregistrate în tabelul 2.

Tabelul 2. Cercetarea stabilității acidului ascorbic (AA), în funcție de temperatură, cu conținut diferit de acid hialuronic (AH), timp de 8 ore

C _{AA} \ C _{AH}		0,2%	0,02%	0,002%	0,0002%	0,00002%	0%
		Absorbanța					
12,5 · 10 ⁻⁴ %	4-5° C	0,04	0,05	0,09	0,26	0,30	0,31
12,5 · 10 ⁻⁴ %	25° C	0,09	0,15	0,17	0,27	0,29	0,30
12,5 · 10 ⁻⁴ %	50° C	0,18	0,20	0,22	0,26	0,26	0,28
12,5 · 10 ⁻⁴ %	75° C	0,20	0,18	0,19	0,15	0,11	0,20

Din datele obținute rezultă că odată cu creșterea temperaturii, acidul ascorbic în soluție, în lipsa acidului hialuronic degradează, stabilitatea lui se micșorează. Acidul ascorbic în prezența acidului hialuronic la concentrații de 2 · 10⁻¹–2 · 10⁻³ și temperatura 5–25°C, în soluție, rămâne stabil, practic nu este oxidat de ionii Fe³⁺. La creșterea temperaturii și micșorarea concentrației acidului hialuronic în soluție, stabilitatea acidului ascorbic se micșorează. Acest comportament poate fi explicat prin faptul că la adăugarea ionilor Fe³⁺ are loc formarea compușilor complecși cu acidul hialuronic și vâscozitatea înaltă a soluțiilor la temperatura 5–25°C nu permit oxidarea acidului ascorbic de ionii Fe³⁺, în rezultat nu se formează ionii Fe²⁺ și nu decurge reacția cu K₃[Fe(CN)₆].

Rezultatele obținute vor fi luate în considerație la cercetările viitoare a proprietăților fizico-chimice ale acidului hialuronic.

Concluzii

În rezultatul cercetărilor s-a determinat că stabilitatea acidului ascorbic în soluție, este influențată de prezența acidului hialuronic. Macromolecula acidului hialuronic conține un număr sporit de grupe funcționale capabile să complexeze cu ionii metalelor, în particular cu ionii Fe^{3+} , Fe^{2+} , micșorând astfel concentrația lor în soluție și capacitatea de a oxida moleculele acidului ascorbic.

Vâscozitatea înaltă a soluțiilor de acid hialuronic micșorează difuzia oxigenului din aer în soluție, astfel împiedică oxidarea acidului ascorbic, măbind stabilitatea soluțiilor.

Bibliografie

1. <http://farmchem.ru/biologicheski-aktivnyie-prirodnyie-soedineniya/glitsidy/kislota-askorbinovaya-vitam.html>
2. Ball, G. F. M., Chemical and biological nature of the water-soluble vitamins, In Water Soluble Vitamin Assays in Human Nutrition, Chapman and Hall, New York, 1994, chap. 2.
3. Zadorojnâi L. Despre unele aspecte ale acidului hialuronic obținut din diverse surse naturale. Meridian Ingineresc, Chișinău, 2005, Nr. 2, p. 54-57..
4. Chirița M. Biopolimeri și compozite naturale, Ed. Tehnica-INFO, Chișinău, 2001, P. 183-192.
5. Строителев В.В., Федорищев И.А., Гиалуроносовая кислота -биологически активное вещество, обладающее защитным и иммуномодулирующими свойствами. Вестник новых медицинских технологий, 1997, Т. IV, № 3.
6. Bezdrigin Mariana „Acțiunea biologică, biocompatibilitatea și inofensivitatea acidului hialuronic obținut din diferite surse naturale”. Realizări științifice în farmacologie. Chișinău, 1999, p.171-177.
7. V. Lutan ș.a., Acidul Hialuronic-procedee biochimice, efectele biologice și perspectivele utilizării în medicină, farmaceutică și cosmetologie, Anale științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițeanu”, “Probleme medico-biologice și farmaceutice” Vol. I, Chișinău, 2005, Ed. VI, P. 181-184..
8. Zadorojnâi L., Vlad P., Ungur N., Zadorojnâi A.,” Derivați funcționalizați ai acidului hialuronic - purtători de principii bioactive”, Book of Abstracts XXX-th Romanian Chemistry Conference. Călimănești-Căciulata, Rm. Vâlcea, România, 8-10 october, 2008, p. 67.
9. Zadorojnâi A., Zadorojnâi L.”Modificarea acidului hialuronic cu compuși bioactivi”, Book of Abstracts XXX-th Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Rm. Valcea, Romania, 8-10 october, 2008, p. 29, (prezentare), ISBN 978-973-750-124-0.
10. Zadorojnâi L. Zadorojnâi A., M. Mihai „Obținerea sintonilor pentru modificarea chimică a acidului hialuronic cu compuși biologic activi”, Teze la Conferința Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților Universității Tehnice a Moldovei, Chișinău, U.T.M., 10-12 decembrie, 2009, Vol. II, p. 105-106, ISBN 978-9975-45-142-0.
11. Бородин Е.А. и др., Способ определения содержания аскорбиновой кислоты. Патент RU 2490628, Бюл. N 23, 20.08.2013.