



Universidade Estadual Paulista – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



JOSÉ ROBERTO STEFANELLI JUNIOR

**Obtenção e avaliação das
potencialidades biológicas de complexos
metálicos de Zn e Co contendo proteínas
hidrolisadas do soro do leite**

Araraquara
2013

JOSÉ ROBERTO STEFANELLI JUNIOR

**Obtenção e avaliação das
potencialidades biológicas de complexos
metálicos de Zn e Co contendo proteínas
hidrolisadas do Soro do Leite**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: *Prof^a. Dr^a. Regina Célia Galvão Frem*

Araraquara

2013

FOLHA ESCANEADA DA BANCA

DADOS CURRICULARES

1 Dados Pessoais

Nome: José Roberto Stefanelli Junior

Data de nascimento: 10/06/1979.

Nacionalidade: Brasileira.

Naturalidade: Sete Lagoas - MG.

Filiação:

Pai: José Roberto Stefanelli.

Mãe: Maria Percília Garcia Stefanelli.

Endereço Residencial: Rua Gasparino de Andrade, 309
Centro–37975-000
Itaú de Minas – MG– Brasil

Telefones:

Residencial: (35) 3536-3294

Celular: (16) 98203-4276.

e-mail: jrstefanelli@yahoo.com.br

2 Formação Acadêmica

Graduações:

2000-2004

Farmácia-Bioquímica

Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP – Campus de Araraquara – SP.

2006

Licenciatura em Química

Universidade de Franca – UNIFRAN, pelo Programa Especial de Formação Pedagógica de Docentes.

3 Atuação profissional

Professor de Química e Física:

- **INSTITUTO MOURA LACERDA** – Jaboticabal / SP – 2012 a 2013.
- **MAQUIFÍSICA** – Araraquara / SP – 2011 a 2013.
- Colégio Interativo (**CECI**) – Itaú de Minas / MG – 2005 a 2011.

Professor de Química:

- Colégio Educare – Itápolis / SP – 2013
- Colégio São Francisco (**COC**) – Passos / MG – 2008 a 2009.
- Escola Técnica de Passos (**ETEP**) – Passos / MG – 2005 a 2011.
- Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica – Escola Estadual **Ary Pimenta Bugelli** – Itaú de Minas / MG – 2005.
- Cursinho Pré Vestibular Popular (**CUCA**) da UNESP – Araraquara / SP – 2001 a 2004.

Professor de Física:

- Cursinho Pré Vestibular Popular (**EDUCAFRO**) – Itaú de Minas – MG – 2011.

4 Atividades Científicas

4.1 Trabalhos em Congressos

STEFANELLI JR., J. R.; Ferrarini, F. O. C.; Silva, P. B.; Pavan, A. R.; Monti, R.; Frem, R. C. G.. Obtenção e avaliação das potencialidades biológicas de complexos de cobalto contendo proteínas hidrolisadas do soro de leite. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 36^a, 2013, Águas de Lindóia. **Painéis**. Águas de Lindóia, 2013. p. 56.

4.2 Participação em eventos científicos

Participação no módulo temático *"HPLC: aplicação na área farmacêutica e atualidades da técnica"* realizado nos dias 20 e 21 de agosto de 2011 pela 58ª Jornada Farmacêutica da UNESP de Araraquara, ministrado pelo Prof. Álvaro José dos Santos Neto (IQSC - USP) e pela Ana Laís Nascimento Vieira, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

Participação no mini-curso *"Estudo de casos como metodologia para o ensino de Química"*, ministrado pela Prof^a. Dr^a. Salete Linhares de Queiroz e, participação da Oficina *"Jogos didáticos no ensino de Química"*, ministrado pelo Prof. Dr. Márlon Soares durante o IX Evento de Educação em Química, realizado no período de 31 de agosto a 02 de setembro de 2011, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

Participação no *Encontro de Pós-Graduação em Química do Interior Paulista do Programa de Pós-Graduação em Química – IQ-UNESP*, realizado pelo Instituto de Química de Araraquara – UNESP, no dia 10 de outubro de 2011.

Participação no mini-curso *"A interdisciplinaridade no ensino de Química"*, ministrado pelo Prof. Dr. Pedro Faria dos Santos Filho durante o X Evento de Educação em Química, realizado no período de 29 a 31 de agosto de 2012, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

5 Bolsas

- Bolsista **CNPq** no desenvolvimento deste projeto para obtenção do título de mestre no Instituto de Química da UNESP Araraquara - SP, 2011 a 2013.
- Professor bolsista do Cursinho Pré Vestibular Popular (**CUCA**) da UNESP de Araraquara – SP, 2001 a 2004.

Aos meus pais, exemplos de vida, José Roberto Stefanelli (in memoriam) e Maria Percília Garcia Stefanelli, que sempre me estimularam a conquistar meus objetivos. Estas duas pessoas, mesmo que uma delas não se encontra mais aqui no plano terrestre, sempre, com muito esforço, paciência, trabalho, sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado, encorajando-me nas horas difíceis e aplaudindo-me nos momentos de glória. Obrigado por serem meus pais, pessoas íntegras, justas, corretas e competentes, e com certeza fonte de inspiração, meus exemplos de vida, orgulho e ensino diário.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a **DEUS** por me proporcionar sabedoria, saúde, força e fé para superar todos os momentos difíceis e, que sem **ELE**, certamente não teria dado conta de chegar até onde cheguei. Aprendi que nenhum obstáculo é grande demais quando se confia **NELE**.

À minha orientadora, professora e amiga, **Regina Frem**, minha segunda mãe, exemplo de profissional e de vida a ser seguido. Muito obrigado pelos ensinamentos diários, confiança, incentivos, generosidade, paciência, boa vontade, carinho e respeito. Aonde quer que eu vá e aonde quer que eu esteja, levarei guardado comigo pelo resto da minha vida o orgulho de ter sido seu aluno e por ter trabalhado ao seu lado.

Aos meus pais, **José Roberto** (*in memoriam*) e **Maria Percília**, por me darem educação e ensinamentos diários para me tornar uma pessoa honesta e de cheia de valores. Ao meu pai (*in memoriam*), onde quer que esteja, obrigado pelos ensinamentos, incentivos, apoio, confiança e por nunca ter desistido de mim, fica aqui o meu amor eterno. À minha mãe, amor eterno e incondicional, que sempre esteve do meu lado, que por muitas e muitas vezes, abriu mão dos seus próprios sonhos, desejos e vontades, para que eu pudesse realizar os meus, e neste momento, partilho com a senhora esta minha conquista.

Aos meus irmãos, **Karina e Rogério**, que sempre confiaram e acreditaram no meu potencial, obrigado pela confiança, carinho e respeito.

Ao meu tio, amigo e “segundo pai”, **Tio José Zote**, muito obrigado por me ensinar a ser uma pessoa honesta, humilde, dedicada, batalhadora e por me ajudar em tudo. Se consegui chegar aonde cheguei, devo muito a você.

A todas os outros familiares: ao meu sobrinho **Pietro**, minha avó **Mercedes**, aos meus tios e tias, em especial a tia “**Cidinha**”, aos meus primos e primas, ao meu

cunhado **Giuliano**, mesmo estando distante de todos, carregou todos vocês dentro do meu coração.

Aos meus amigos e professores colaboradores, **Rubens Monti** e **Eduardo Maffud Cilli**, pelas paciências e ensinamentos teóricos e práticos. Obrigado pelo que vocês são e saibam que sem a participação de vocês nada disto teria acontecido.

Aos amigos, laboratórios e professores colaboradores deste trabalho:

A **Juliana** do Laboratório de **Enzimologia** pelos ensinamentos e paciência, ao **Antônio** e a **Ana**.

Ao Laboratório de **Bioquímica**, iniciando pelo meu VERDADEIRO AMIGO, **Eduardo “Lentilha”**, amigo de longa data, profissão, república, que sempre me ajudou a realizar as análises e também pelos incentivos, ensinamentos, conversas e risadas. A todos professores do departamento e aos amigos acadêmicos, **Esteban “Argentino”**, **Graziely**, **Edson “Araketo”** e **Davi “Pardal”**. Aos professores Maria Célia Bertolini, Saulo Santesso Garrido e Reinaldo Marchetto.

Ao Laboratório de **Microbiologia**, iniciando pelo meu amigo **Leonardo Marino**, amigo de profissão e república que realizou as análises e por me ajudar sempre e, a todos os professores do Departamento, especialmente a **Prof^a Clarice Queico Fujimura Leite** e ao **Prof. Fernando Rogério Pavan** por sempre me ajudarem quando solicitados.

A todos do Departamento de Química Geral e Inorgânica (**DGQI**), amigos e colegas com quem trabalhei e compartilhei experiências: aos técnicos **Irene**, **Rafael**, **Serginho**, aos amigos acadêmicos **Antônio**, **Silmar “Porpeta”**, **Elaine**, **Sahra**, **Cris**, **Gislaine**, **Noelle**, **Ana Paula**, **Carol**, **Daniel “Homer”**, **Rodrigo**, **Gustavo**, em especial ao **Francisco Ferrarini “Chico”** que me ajudou a desenvolver o projeto, ao **Fellipe**, **Ronaldo** e **Marcelo Lahoud “Garotinho dos monocristais”** pela paciência, dedicação e ensinamentos, aos IC's **Aline**, **Vitor** e **Paulinha**, e a todos professores do departamento que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste projeto. Aos professores **Adelino Vieira de Godoy Netto**, **Stanlei I. Klein**, **Sérgio**

Leite, Édison Pecoraro, Marian Rosaly Davolos, Luiz Antônio A. Oliveira, Antonio Eduardo Mauro, Vânia M. Nogueira e Sidney José Lima Ribeiro.

A **Patrícia Bento “Pat”**, pós-graduanda do DQGI, amiga, companheira, obrigado pelos ensinamentos, apoios, ajudas e por sempre estar comigo em todos os momentos na execução deste projeto. Não tenho palavras para descrever sua generosidade, paciência e nem tenho dinheiro para pagá-la por tudo aquilo que fez por mim. Obrigado **“Pat”** por tudo aquilo que aprendi e saiba que sempre que precisar pode contar comigo.

A todos os outros professores e colaboradores dos outros departamentos, laboratórios e instituições que foram parceiros e que ajudaram na realização deste projeto, especialmente ao **Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida** pela realização das análises térmicas (curvas TG), meu muito obrigado.

Aos meus amigos da **República Caverna**: Ao **“Lentilha”**, pessoa que ainda me deve duas caixas de cerveja, por apostar comigo que se eu passasse na seleção do mestrado era uma caixa, e que se fosse em primeiro lugar era mais uma, **“Marquinhos”**, **“Padoca”**, **Edmar**, **Bruxão**, **“Limão”**, **“Piriquito”**, **“Bronha”**, **“Pepe”**, **Leonardo**, **“Mini-Min”**, **“Terezão”**, **Elias**, **“Dalsim”**, **“Guaiamum”**, **“Botinha”**, **“Peter”**, **“Sojo”**, **“Zulu”** e as nossas “maezonas” **Silvia** e **Dona Ana** e a Juliana **“Mentira”**.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me incentivando e aconselhando com muito amor, carinho e dedicação, especialmente ao casal **Evandro** e **Juliana Barreto VERDADEIROS AMIGOS** que são amigos de longa data, e também a **Meirijane**, o **Paulo “Escobar”**, a **Vânia**, e ao amigo da turma 71 de farmácia-bioquímica UNESP, **Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos**, atual professor na faculdade de ciências farmacêuticas da UNESP de Araraquara no departamento de Ciências Farmacêuticas.

A todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.”

*São Tomás de Aquino
Apud Farias, (2013, p. 15)*

RESUMO

O trabalho consiste em sintetizar e estudar amostras de cobalto e zinco contendo hidrolisados proteicos do soro do leite. A motivação do trabalho está centrada no fato deste ser um material altamente nutritivo, podendo portanto ser aproveitado como suprimento alimentar. A literatura recente tem reportado o fato de que a biodisponibilidade de oligoelementos, quando administrados na forma quelatada, é aumentada em comparação com os sais inorgânicos, comumente utilizados como fontes de minerais. Como objetivo secundário, tem-se a responsabilidade ambiental de evitar o descarte inadequado do soro de leite pelas indústrias de laticínios, já que trata-se de um produto altamente poluente (DBO da ordem de 25.000 - 80.000 mg O₂/L). A fase inicial do trabalho foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara e consistiu nas etapas de obtenção, tratamento, hidrólise enzimática e liofilização do soro do leite. Os resultados obtidos da eletroforese SDS-PAGE e dos aminogramas permitiram concluir que a hidrólise conduziu à formação de aminoácidos. A segunda fase do trabalho, realizada no Departamento de Química Geral e Inorgânica deste Instituto, compreendeu a síntese e estudo das diversas amostras obtidas, contendo cobalto ou zinco e o hidrolisado proteico, dependendo da rota de síntese escolhida e/ou das condições reacionais utilizadas (natureza do material de partida, solvente, pH, temperatura, etc.). A idéia maior do projeto é que essas amostras de coordenação contendo ligantes de origem natural possam integrar uma lista multimineral a ser testada posteriormente como metalofármacos (Ag, Pd, Pt) ou substâncias nutracêuticas (Cu, Zn, Co, Fe).

Palavras-chave: Cobalto(II). Zinco(II). Soro do leite. Ligantes de origem natural. Metalofármacos. Substâncias nutracêuticas.

ABSTRACT

This study consists of synthesis and evaluation of cobalt and zinc compounds containing proteic hydrolyzates from whey. The motivation of the study is focused on the fact that is a highly nutritive material, which can be used, therefore, as food supply. The recent literature has reported that the bioavailability of trace elements, when administrated in the chelated form, is increased in comparison with the inorganic salts, mostly used as minerals sources. As a secondary objective, it has environmental responsibility to avoid the inappropriate discard of the whey by dairy industries, since it is a highly pollutant product (biological Oxygen Demand of the order of 25,000 - 80,000 mg O₂/L). The initial stage of the study was performed in the laboratory of enzymology, Faculdade de Ciências Farmacêuticas of UNESP - Araraquara and consisted in the steps of extraction, treatment, hydrolysis and freeze-drying of the whey. The results from SDS-PAGE electrophoresis and aminograms revealed that the enzymatic hydrolysis was effective and led to the release of amino acids. The second stage of the study, performed on Departamento de Química Geral e Inorgânica of this Institute, comprised the synthesis and study of the several compounds obtained containing cobalt or zinc ions and the proteic hydrolyzate, by different synthetic routes and experimental conditions (such as material nature, solvent, pH, temperature, etc.). The major goal of the project is that different coordination compounds containing natural ligands could compose a multimineral list to be tested as metallodrugs (Ag, Pd, Pt) or nutraceutical substances (Cu, Zn, Co, Fe).

Keywords: Cobalt(II). Zinc(II). Whey. Natural ligands. Metallodrugs. Nutraceutical substances.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Vitamina B ₁₂ .	27
Figura 2 – Aminoácidos como quelantes de metais.	32
Figura 3. Estruturas propostas para as espécies dimérica (a) e monomérica (b) do Co(III).	34
Figura 4 - Os três tipos de coordenação do oxigênio ao íon metálico.	35
Figura 5 - Esquema das reações de formação dos complexos ativos e adutos oxigenados.	35
Figura 6 - Estrutura proposta para o dímero em solução.	36
Figura 7 - Fórmula molecular proposta para os complexos de Co (II) contendo aminoácidos.	37
Figura 8 - Estrutura octaédrica levemente distorcida da amostra [Co(II)(L-prolina) ₂ (H ₂ O) ₂].	38
Figura 9 - Estrutura do complexo Tp*Zn-AA.	39
Figura 10 - Geometria do complexo [Zn(CysGly)(HisGly)].	40
Figura 11 - Estrutura computadorizada do peptídeo P22 (à esquerda) e seu complexo de zinco (à direita).	41
Figura 12 - Representações do zinco coordenado tetraédricamente nas três espécies nativas das proteínas do tipo <i>dedos de zinco</i> : (A) Cys ₄ , (B) Cys ₃ His, (C) Cys ₂ His ₂ .	41
Figura 13 - Liofilizador L101 e Soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente.	50
Figura 14 - Esquema da rota de síntese convencional.	51
Figura 15 - Copo de teflon e reator metálico utilizado na síntese hidrotérmica.	52
Figura 16 - Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.	63
Figura 17 - Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.	65
Figura 18 - SDS-PAGE do produto de hidrólise da pepsina, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina utilizando soro do leite como substrato.	66
Figura 19 - Aminograma obtido do soro hidrolisado enzimaticamente.	68
Figura 20 - Aminograma padrão.	69
Figura 21 - Espectros vibracionais no IV das proteínas e do soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (SLHEnz).	71
Figura 22 - Espectros vibracionais no IV dos precursores de cobalto.	74
Figura 23 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra A.	76
Figura 24 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra B.	78
Figura 25 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra C.	80

Figura 26 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra D.	82
Figura 27 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra E.	84
Figura 28 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra F.	87
Figura 29 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra G.	90
Figura 30 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra H.	92
Figura 31 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra I.	94
Figura 32 - Espectros vibracionais no IV do SLHEnz e da amostra J.	96
Figura 33 - Curvas TG e DTA da amostra A.	100
Figura 34 - Curvas TG e DTA da amostra B.	101
Figura 35 - Curvas TG e DTA da amostra C.	102
Figura 36 - Curvas TG e DTA da amostra D.	103
Figura 37 - Curvas TG e DTA da amostra E.	104
Figura 38 - Curvas TG e DTA da amostra F.	105
Figura 39 - Curvas TG e DTA da amostra G.	106
Figura 40 - Curvas TG e DTA da amostra H.	107
Figura 41 - Curvas TG e DTA da amostra I.	108
Figura 42 - Curvas TG e DTA da amostra J.	109
Figura 43 - Difratoograma de raios-X da amostra Zn-C ₅ .	110
Figura 44 - Difratoograma de raios-X da amostra HT-Zn-N ₁ .	110
Figura 45 - Coordenação do Ferro na ovotransferrina.	123
Figura 46 - Coordenação do alumínio a 4 aminoácidos.	123

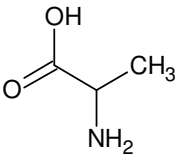
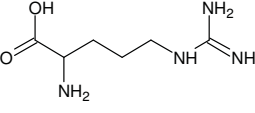
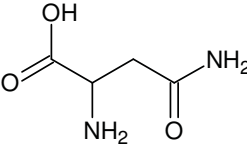
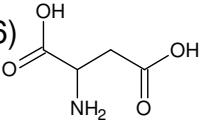
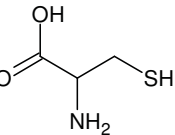
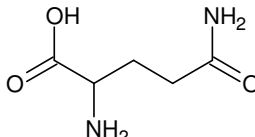
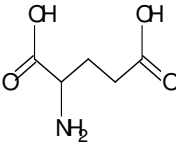
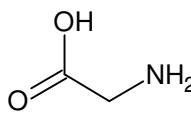
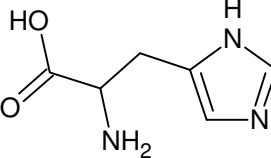
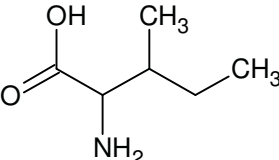
LISTA DE TABELAS

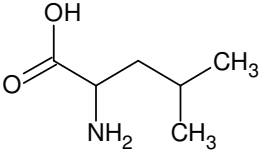
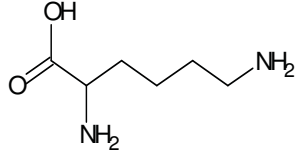
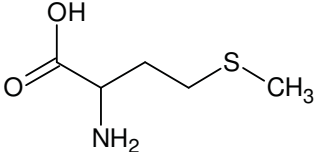
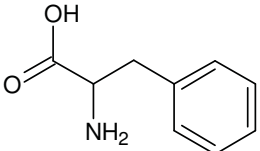
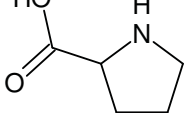
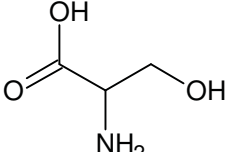
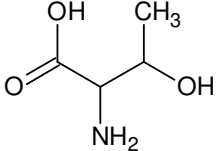
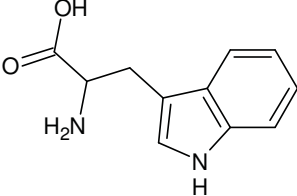
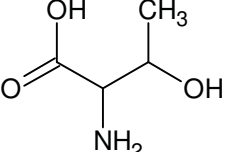
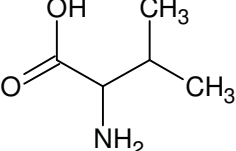
Tabela 1 - Dados do leite e de sua produção por novilhas primíparas que receberam suplementos contendo metais inorgânicos (IOMs) ou “aminoácidos quelatos” (AACS) em um período de ordenha de até 305 dias.	30
Tabela 2 - Concentração e porcentagens das principais proteínas do soro do leite.	43
Tabela 3 - Composição em aminoácidos do hidrolisado do soro do leite.	44
Tabela 4 - Reagentes e solventes utilizados.	47
Tabela 5 - Condições reacionais adotadas pela síntese C ₁ .	52
Tabela 6 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses C _{5B} , N ₁ e N ₂ .	53
Tabela 7 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses hidrotérmicas HT-C ₁ , HT-C ₂ , HT-C ₃ e HT-C ₄ .	54
Tabela 8 - Rendimento das sínteses realizadas na obtenção da amostra A.	54
Tabela 9 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses C ₂ e C ₃ .	54
Tabela 10 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses C ₄ e C _{5A} .	55
Tabela 11 - Condições reacionais adotadas pela síntese hidrotérmica HT-N ₂ .	55
Tabela 12 - Condições reacionais adotadas pela síntese S ₁ .	55
Tabela 13 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses Zn-C ₅ , Zn-N ₁ , HT-Zn-N ₁ e HT-Zn-N ₃ .	56
Tabela 14 - Rendimento das sínteses realizadas na obtenção da amostra F.	56
Tabela 15 - Condições reacionais adotadas pela síntese HT-Zn-C ₁ .	56
Tabela 16 - Condições reacionais adotadas pela síntese HT-Zn-N ₂ .	57
Tabela 17 - Condições reacionais adotadas pela síntese HT-Zn-C ₃ .	57
Tabela 18 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses Zn-C ₁ e Zn-C ₂ .	57
Tabela 19 - Determinação da quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.	63
Tabela 20 - Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.	65
Tabela 21 - Principais frequências vibracionais no IV (cm ⁻¹) referente as proteínas e ao SLHEnz e suas respectivas atribuições.	72
Tabela 22 - Frequências vibracionais no IV (cm ⁻¹) referentes aos precursores CoCl ₂ ·6H ₂ O, Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O e CoSO ₄ ·7H ₂ O e suas respectivas atribuições.	75
Tabela 23 - Frequências vibracionais no IV (cm ⁻¹) referente ao SLHEnz e a amostra A e suas respectivas atribuições.	77
Tabela 24 - Frequências vibracionais no IV (cm ⁻¹) do SLHEnz e amostra B e suas respectivas atribuições.	79

Tabela 25 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra C e suas respectivas atribuições.	81
Tabela 26 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra D e suas respectivas atribuições.	83
Tabela 27 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra E e suas respectivas atribuições.	85
Tabela 28 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra F e suas respectivas atribuições.	88
Tabela 29 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra G e suas respectivas atribuições.	91
Tabela 30 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra H e suas respectivas atribuições.	93
Tabela 31 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra I e suas respectivas atribuições.	95
Tabela 32 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referentes ao SLHEnz e a amostra J e suas respectivas atribuições.	97
Tabela 33 - Dados da complexometria, análise elementar, intervalo de decomposição e cores das amostras sintetizadas.	98
Tabela 34 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra A.	100
Tabela 35 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra B.	101
Tabela 36 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra C.	102
Tabela 37 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra D.	103
Tabela 38 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra E.	104
Tabela 39 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra F.	105
Tabela 40 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra G.	106
Tabela 41 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra H.	107
Tabela 42 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra I.	108
Tabela 43 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra J.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 Aminoácidos, valores de pK_s e fórmulas estruturais

Ala	Alanina pK (α-COOH: 2,34; α-NH ₃ : 9,69)	
Arg	Arginina pK (α-COOH: 2,17; α-NH ₃ : 9,04; R: 12,48)	
Asn	Asparagina pK (α-COOH: 2,02; α-NH ₃ : 8,80)	
Asp	Ácido aspártico pK (α-COOH: 2,09; α-NH ₃ : 9,82; R: 3,86)	
Cys	Cisteína pK (α-COOH: 1,96; α-NH ₃ : 10,28; R: 8,18)	
Gln	Glutamina pK (α-COOH: 2,17; α-NH ₃ : 9,13)	
Glu	Ácido Glutâmico pK (α-COOH: 2,19; α-NH ₃ : 9,67; R: 4,25)	
Gly	Glicina pK (α-COOH: 2,34; α-NH ₃ : 9,60)	
His	Histidina pK (α-COOH: 1,82; α-NH ₃ : 9,17; R: 6,00)	
Ile	Isoleucina pK (α-COOH: 2,36; α-NH ₃ : 9,68)	

Leu	Leucina pK (α -COOH: 2,36; α -NH ₃ : 9,60)	
Lys	Lisina pK (α -COOH: 2,18; α -NH ₃ : 8,95; R: 10,53)	
Met	Metionina pK (α -COOH: 2,28; α -NH ₃ : 9,21)	
Phe	Fenilalanina pK (α -COOH: 1,83; α -NH ₃ : 9,13)	
Pro	Prolina pK (α -COOH: 1,99; α -NH ₃ : 10,60)	
Ser	Serina pK (α -COOH: 2,21; α -NH ₃ : 9,15)	
Thr	Treonina pK (α -COOH: 2,63; α -NH ₃ : 10,43)	
Trp	Triptofano pK (α -COOH: 2,38; α -NH ₃ : 9,39)	
Tyr	Tirosina pK (α -COOH: 2,20; α -NH ₃ : 9,11; R: 10,05)	
Val	Valina pK (α -COOH: 2,32; α -NH ₃ : 9,62)	

2 Outras abreviações

AACS	Suplemento contendo aminoácidos quelatados
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CoA	Coenzima A
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DEAE	Dietilaminoetil
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNS	Ácido 3-5´dinitrosalicílico
DTA	Análise Térmica Diferencial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EtOH	Etanol
<i>f</i>	fraca
<i>F</i>	Forte
FTIR	“Fourier Transform Infrared Spectroscopy”
ICP-AES	“Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry”
IV	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho
<i>m</i>	Média
<i>mf</i>	Muito Fraca
<i>MF</i>	Muito Forte
MOFs	Metal Organic Frameworks
<i>om</i>	Ombro
OPA	Orto-ftalaldeído
PAGE	Gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLHEnz	Soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente
SHEnz	Soro do leite hidrolisado enzimaticamente
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

ν	Estiramento
ν_{as}	Estiramento assimétrico
ν_s	Estiramento simétrico
δ	Deformação angular simétrica no plano (tesoura)
ρ	Deformação angular assimétrica no plano (balanço)
ω	Deformação angular simétrica fora do plano (torção)
τ	Deformação angular assimétrica no plano (abano)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Cobalto	26
1.1.1	A Química do cobalto	26
1.1.2	A importância biológica do cobalto	26
1.2	Zinco	29
1.2.1	A Química do zinco	29
1.2.2	A importância biológica do zinco	29
1.3	Formação dos quelatos	31
1.4	Aminoácidos como ligantes para formação de quelatos	33
1.5	Propriedades físico-químicas, biológicas e nutricionais de complexos metálicos contendo aminoácidos e dipeptídeos	34
1.6	O soro do leite	42
1.6.1	O leite e sua composição	42
1.6.2	Principais proteínas do soro do leite e seu valor nutricional	42
1.6.3	Soro do leite: uma questão ambiental	43
1.6.4	Soro do leite – fonte natural de ligantes	44
2	OBJETIVOS	46
3	PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1	Reagentes e solventes utilizados	47
3.2	Equipamentos	48
3.3	Soro do leite	49
3.3.1	Obtenção do soro do leite hidrolisado.	49
3.3.2	Liofilização do soro do leite hidrolisado	50
3.3.3	Análises	50
3.4	Síntese das amostras de cobalto e zinco	51
3.4.1	Precursores	51
3.4.2	Rotas de síntese	51
3.4.3	Amostras Sintetizadas	52
3.4.3.1	Amostras de Cobalto	52
3.4.3.1.1	Amostra A	52
3.4.3.1.2	Amostra B	54
3.4.3.1.3	Amostra C	54
3.4.3.1.4	Amostra D	55

3.4.3.1.5	Amostra E	55
3.4.3.2	Amostras de Zinco	56
3.4.3.2.1	Amostra F	56
3.4.3.2.2	Amostra G	56
3.4.3.2.3	Amostra H	57
3.4.3.2.4	Amostra I	57
3.4.3.2.5	Amostra J	57
4	MÉTODOS INSTRUMENTAIS	58
4.1	Dosagem de açúcar redutor no soro do leite	58
4.2	Dosagem de proteínas no soro do leite	58
4.3	Eletroforese SDS-PAGE	58
4.4	Aminograma por CLAE do SLHEnz	59
4.5	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	59
4.6	Análise do Teor de Cobalto e Zinco via Complexometria com EDTA	59
4.7	Análise Elementar	60
4.8	Determinação do Intervalo de Decomposição.	60
4.9	Termogravimetria (TG) – Análise Térmica Diferencial (DTA)	60
4.10	Difratometria de Raios-X: método do Pó	61
5	ENSAIO BIOLÓGICO	62
5.1	Determinação da Atividade Biológica frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis in vitro</i>	62
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	Dosagem de açúcar redutor no soro do leite	63
6.2	Dosagem das proteínas	64
6.3	Eletroforese do produto de hidrólise enzimática obtido do soro de leite como substrato	66
6.4	Aminograma do SLHEnz	67
6.5	Espectroscopia vibracional na região no infravermelho	70
6.5.1	Infravermelho das proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise e do soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (SLHEnz)	71
6.5.2	Infravermelho dos Precursores	74
6.5.3	Infravermelho das Amostras sintetizadas	76
6.5.3.1	Amostras de cobalto	76
6.5.3.1.1	Amostra A	76
6.5.3.1.2	Amostra B	78

6.5.3.1.3	Amostra C	80
6.5.3.1.4	Amostra D	82
6.5.3.1.5	Amostra E	84
6.5.3.2	Amostras de Zinco	87
6.5.3.2.1	Amostra F	87
6.5.3.2.2	Amostra G	89
6.5.3.2.3	Amostra H	92
6.5.3.2.4	Amostra I	94
6.5.3.2.5	Amostra J	96
6.6	Complexometria com EDTA, Análise Elementar e Intervalo de Decomposição	98
6.7	Análise térmica (TG/DTA) das amostras de cobalto e zinco	100
6.7.1	Amostras de Cobalto	100
6.7.1.1	Amostra A	100
6.7.1.2	Amostra B	101
6.7.1.3	Amostra C	102
6.7.1.4	Amostra D	103
6.7.1.5	Amostra E	104
6.7.2	Amostras de Zinco	105
6.7.2.1	Amostra F	105
6.7.2.2	Amostra G	105
6.7.2.3	Amostra H	106
6.7.2.4	Amostra I	107
6.7.2.5	Amostra J	108
6.8	Difratometria de Raios-X: método do pó	110
6.9	Ensaio Biológico	112
6.9.1	Determinação da Atividade Biológica frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis in vitro.</i>	112
7	CONCLUSÕES	113
8	PERSPECTIVAS	114
	REFERÊNCIAS	116
	APÊNDICE	123

1 INTRODUÇÃO

Os compostos inorgânicos asseguram a existência dos seres vivos no planeta. Suas funções biológicas são determinadas por suas estruturas, composições e propriedades químicas. A sistematização dos compostos inorgânicos que estão presentes no meio biológico ou que nele sejam incorporados com fins medicinais constitui o ramo da Química Bioinorgânica.¹

Os elementos encontrados em pequenas quantidades (mg/kg ou ppm) no organismo são chamados de elementos traços, microelementos ou oligoelementos, como exemplos, o cobalto e o zinco. Os elementos traços podem desempenhar três importantes funções no nosso organismo, sendo estas: estrutural, catalisadora e físico-química² e suas concentrações variam em função do tipo de tecido. De um modo geral, limites estreitos são mantidos para a integridade e funcionalidade dos tecidos, visando níveis satisfatórios para o crescimento e manutenção da vida.

Enzimas que utilizam íons metálicos como cofatores para diminuir a energia de ativação de rompimento das ligações químicas são chamadas de metaloenzimas.³ Como será visto mais adiante nesse texto, o zinco, por exemplo, atua como centro catalítico em mais de 200 metaloenzimas nos tecidos humanos, como na anidrase carbônica presente nos eritrócitos (glóbulos vermelhos), que participam do transporte do dióxido de carbono desde os tecidos até os pulmões. A enzima é responsável pela conversão catalítica entre a água e CO₂ na formação do ácido carbônico. A desidratação do ácido carbônico libera CO₂, que abandona o eritrócito, passando para o plasma sanguíneo e deste para o ar pulmonar, processo importante na respiração.

No que diz respeito à participação desses elementos na alimentação animal, o principal obstáculo para a criação de rebanhos em quase todas as regiões do mundo é a deficiência do cobalto, zinco e cobre. A subnutrição mineral é o principal fator que limita a criação dos animais nos pastos e, a suplementação mineral na ração utilizando estes íons metálicos torna-se necessária.⁴

De acordo com Moraes et al⁵ e González⁶ as principais deficiências dos elementos traços nos ruminantes no Brasil estão relacionadas ao cobalto e ao cobre. Estas deficiências são devidas às pastagens de algumas regiões do Brasil que

apresentam um solo com excesso de manganês ou condições muito alcalinas, que dificulta a absorção destes microelementos pelas plantas.

1.1 Cobalto

1.1.1 A Química do cobalto

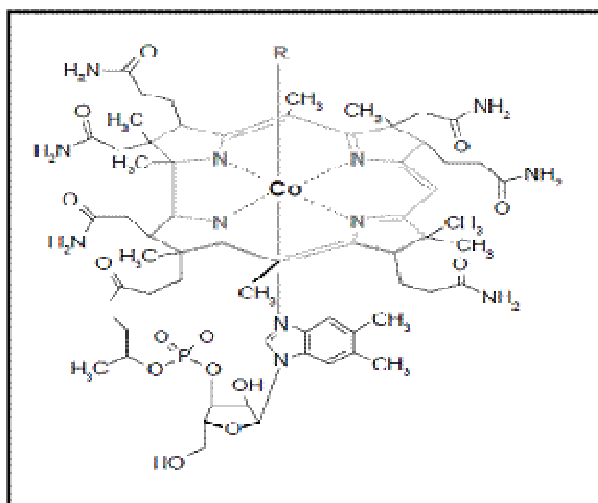
O cobalto é um metal de transição do Grupo 9 da tabela periódica e apresenta dois estados de oxidação mais comuns, Co(II) e Co(III), podendo, no entanto, se encontrar também nos estados de oxidação⁷ de ± 1 a $+4$.

O íon Co(II) tem configuração eletrônica $3d^7$, e os complexos de Co(II) podem apresentar geometrias tetraédricas ou octaédricas preferencialmente. Como a diferença de estabilidade entre as duas formas é pequena, elas podem coexistir em equilíbrio. O íon $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, bem como a maioria dos complexos octaédricos de Co(II), são de spin alto. Os complexos tetraédricos também são comuns e em geral mais coloridos (azuis, verdes) do que os complexos octaédricos (rosa, púrpura).^{8;9}

O Co(III), por sua vez, em solução, pode formar adutos de oxigênio, um dos quais na forma dinuclear, cujos centros metálicos estão interconectados por pontes μ -peróxido. Essas espécies apresentam coloração marrom e estão representadas na Figura 6 do ítem 1.5 desse texto.¹⁰

1.1.2 A importância biológica do cobalto

O elemento cobalto é um constituinte essencial do solo fértil e está presente em algumas enzimas e também no centro ativo da molécula da Vitamina B₁₂ (4%), ilustrada na Figura 1,¹¹ a qual apresenta estocada no fígado.^{2;9}

Figura 1 - Estrutura da Vitamina B₁₂.

Fonte: Paniz, et al. (2005, p. 325).

A digestão dos ruminantes ocorre por um mecanismo particular, diferenciado dos demais animais. Os animais que fazem parte deste grupo são os bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos, girafas, veados e muitas vezes, até os camelos e as lhamas, por possuírem um complexo estômago, com três ou quatro compartimentos. Estes dois últimos são exceções, pois não fazem parte desta sub-ordem.

Os ruminantes se alimentam basicamente de vegetais (folhagens), portanto são considerados herbívoros (consumidores de primeira ordem). Ao longo do aparelho digestório, coexistem bactérias e protozoários que processam a digestão química da celulose, o polissacarídeo responsável pela estruturação da parede celulósica das células vegetais, conferindo maior aproveitamento energético aos ruminantes. Os órgãos envolvidos neste processo digestivo realizam a digestão mecânica, proporcionando a fragmentação dos alimentos ingeridos, inicialmente por meio da mastigação efetivada na cavidade bucal, apresentando dentição homodonte (dentes com igual formato e função – maceração). Em seguida o alimento é conduzido até o rúmen (ou pança) por intermédio do esôfago. Após o processamento do alimento no rúmen, o bolo alimentar formado é transportado até o próximo compartimento denominado por retículo (ou barrete), o qual se comunica com outra cavidade, o omaso (ou folhoso) e deste em direção ao abomaso (ou coagulador). Portanto, toda a extensão do aparelho digestório desses animais é formada por um conjunto contendo quatro cavidades, assim caracterizada: rúmen,

retículo, omaso e abomaso, e funcionamento subdividido em duas etapas. Na primeira etapa o alimento é mastigado e enviado para o rúmen e o retículo. Na segunda, o bolo alimentar regurgitado retorna à boca através de contrações similares às que provocam o vômito, sendo novamente mastigado e posteriormente deglutido em direção ao omaso e abomaso.

Nos ruminantes, a exigência de cobalto é maior, pois os microrganismos localizados em seu rúmen sintetizam a vitamina B₁₂ (cianocobalamina)^{12;13}, tornando-os mais dependentes desse íon metálico em comparação aos não-ruminantes³, que não as sintetizam. Ruminantes deficientes de vitamina B₁₂ perdem apetite e conseqüentemente peso e acabam ficando com os músculos fracos¹³ sendo importante, portanto, a suplementação alimentar.

A vitamina B₁₂ presente em alimentos de origem animal é uma molécula orgânica hidrossolúvel muito complexa, requerida no funcionamento de vários sistemas enzimáticos, na utilização de energia, bem como no auxílio na formação de glicose e hemácias.^{12;13} Sua deficiência impede a formação de hemoglobina podendo causar também uma série de lesões no sistema nervoso central.¹²

Uma reação em nosso organismo que requer cofatores derivados da vitamina B₁₂ é a reação que ocorre no catabolismo de ácidos graxos e de alguns aminoácidos que resultam no propionil-CoA que deve ser convertido em succinil-CoA para ser oxidado no ciclo do ácido cítrico, que é a parte principal do metabolismo celular. A enzima metilmalonil-CoA mutase, que é uma das enzimas utilizadas nesta via, requer o derivado 5'-desoxiadenosina da Vitamina B₁₂ como cofator na conversão de metilmalonil-CoA para succinil-CoA.¹⁴

Indivíduos que adotam dieta com baixo teor de proteínas apresentam deficiências de vitamina B₁₂ e problemas na absorção gastrointestinal, levando a transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares. Muitas vezes a deficiência pode permanecer assintomática por longos períodos, desencadeando uma deficiência crônica que, se mantida, pode levar a manifestações neurológicas irreversíveis.¹¹

Anemia megaloblástica e lesões neurológicas são sinais que evidenciam a deficiência de cobalto, e alterações bioquímicas observadas nos tecidos e fluídos do corpo são os sinais clínicos e patológicos desta deficiência.¹⁵

O método para detectar a deficiência de cobalto é por espectrofotometria de absorção atômica ou por radioimunoensaio da vitamina B₁₂ no sangue, que é um método de difícil dosagem, caro e demorado.⁶

1.2 Zinco

1.2.1 A Química do zinco^{4;9;16;17}

O zinco ocorre naturalmente no estado de oxidação Zn(II), no qual os dois elétrons 4s são perdidos e o nível 3d permanece, então, completamente preenchido (configuração eletrônica [Ar]3d¹⁰). Tal situação impossibilita sua participação em reações de óxido-redução, mas permite que ele seja o receptor de um par de elétrons. Devido ao preenchimento completo dos orbitais d, a energia de estabilização do campo ligante dos íons Zn(II) é igual a zero em todas as geometrias de coordenação encontradas, fazendo uma das geometrias ser tão estável quanto às outras, embora na maioria das vezes, os complexos de Zn(II) sejam tetraédricos.

Importante destacar que, do ponto de vista biológico, esta ausência de barreira energética levando a uma diversidade de geometrias de coordenação de acesso semelhante (i.e., indiferentemente de assumir uma ou outra geometria, a energia necessária para manter a estabilidade da ligação é a mesma) permite que as metaloenzimas dependentes de zinco alterem a reatividade do íon metálico e conseqüentemente aumentem a habilidade do zinco em catalisar transformações químicas, acompanhadas de mudanças em sua geometria de coordenação.

O fato de o íon Zn(II) não possuir cor, magnetismo ou propriedades redox, nem proporcionar estabilidade ou inércia a seus complexos, desperta pouco interesse por parte de alguns pesquisadores.¹⁸ Por outro lado, compostos de cobalto, níquel, cobre ou cádmio podem envenenar-nos, ao contrário do zinco que não oferece riscos à saúde.

1.2.2 A importância biológica do zinco

Nenhum outro metal tem tantas funções nos organismos vivos como o zinco. Este mineral essencial atua em diversas funções no organismo e o número de enzimas conhecidas que o contém como centro ativo já ultrapassa 1000.¹⁸ Em 2007, o banco de dados de proteínas continha cerca de 40.000 estruturas, das quais quase 5000 continham o zinco e, verificou-se também que 3% do genoma humano

contêm o código para a proteína conhecida como *dedos de zinco*. Esse íon metálico está presente na enzima anidrase carbônica, sendo importante nas atividades do sistema imunológico, prevenção de formação de radicais livres, crescimento estrutural, desenvolvimento sexual e cognitivo e síntese de DNA.

A deficiência de Zn retarda nos homens o crescimento e prejuízo da maturação sexual (hipogonadismo). A ocorrência dessa deficiência provavelmente se originou devido a uma dieta rica em fitato, no qual pode ter inibido a absorção de Zn.

Além dos fatores citados, a deficiência de zinco provoca também diminuição do apetite e paladar (hipogeusia), diminuição das funções cognitivas, acrodermatite enteropática (alopecia, diarreia e lesões na pele) e deficiências no sistema imune¹⁹.

Uma das formas de combater o déficit de Zn consiste no processo de suplementação via sais inorgânicos ou complexos metálicos.

Dentro desta perspectiva, estudos comparativos (Tabela 1) realizados em novilhas primíparas comprovam a eficiência e vantagem na administração de quelatos metálicos em relação a sais inorgânicos.

O zinco tem papel fundamental no metabolismo do ácido nucléico e de proteínas, em consequência, nos processos fundamentais de multiplicação celular. É um elemento estrutural ou ativador de uma série de enzimas. Ele é necessário para a adequada formação e funcionamento do sistema imunológico na primeira fase de vida do animal.

Tabela 1 - Dados do leite e de sua produção por novilhas primíparas que receberam suplementos contendo metais inorgânicos (IOMs) ou “aminoácidos quelatos” (AACs) em um período de ordenha de até 305 dias.

Grupos de Estudo	Média da Produção, 305 dias (kg)	Média da Gordura Total do Leite (kg)	Média Proteína Total do Leite (kg)
Grupo IOM	10.047 ± 456,36	355,9 ± 46,11 ^a	302,1 ± 40,76 ^c
Grupo AAC	10.568 ± 911,76	389,1 ± 47,02 ^b	326,4 ± 29,89 ^d
Relação IOM/AAC	5,2%	9,3%	8,1%

a,b Diferença significativa P<,01; c,d Diferença significativa P<,05

* Tabela Modificada da Referência.²⁰

Fonte: Ashmead, H. D. e Samford, R. A. (2004, p. 184).

Uma parte do zinco da dieta é absorvida no abomaso (quarta câmara do estômago de ruminantes) e o restante no duodeno. Em seguida, é mobilizado no fígado por uma proteína carreadora específica, denominada metalotioneína. O zinco, ao contrário dos demais elementos, não é estocado em nenhum órgão. Ele se constitui "pool" móvel, comandado por uma proteína específica, que o mobiliza para um tecido ou órgão de maior demanda.

Um exemplo desta situação está na avaliação do envolvimento dos microelementos com a doença da "cara inchada" (CI) ou doença peridentária dos bovinos (CI). A doença desenvolve um processo infeccioso nos maxilares, com perdas dos dentes pré-molares. Foram encontrados teores hepáticos de Zn extremamente altos nos bezerros com CI, que tinham intensa atividade imunológica, em relação aos não afetados pela CI.²¹

É também um elemento muito importante nos processos de resposta imunológica celular e humoral, disfunções endócrinas e situação de estresse.

Deficiência de zinco em animais em pastejo dificilmente se manifesta de uma forma clara, com a sintomatologia clínica bem definida. Deficiências subclínicas são comuns. Vacas e bezerros até um ano de idade pertencem à categoria de animais mais predispostos a esta deficiência.

A carência de zinco incide primeiro no bloqueio da síntese de proteínas; em consequência há redução do apetite, redução na imunocompetência (baixa resistência às infecções), dificuldade de cicatrização das lesões cutâneas, paraqueratose e infertilidade.

Nos machos, diminui a espermatogênese e o crescimento testicular. Nas fêmeas, pode alterar todas as fases do processo reprodutivo, desde o estro ao parto e lactação.²²

A administração de doses orais ou de injeções de compostos à base de zinco pode reduzir o estresse metabólico presente na desmama. Em situações de alta produtividade podem ser aumentados os requisitos para suplementação.

1.3 Formação dos quelatos²³

Estudos com minerais orgânicos ou quelatados têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir a absorção do mineral no trato intestinal, sem entrar no processo de competição iônica (pressão iônica da mucosa intestinal), normalmente determinada pela presença de maior concentração dos íons minerais.

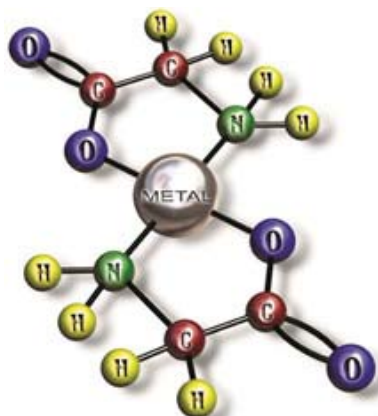
A palavra "quelato" vem do grego "*chele*" que significa "garra", um termo adequado para descrever a maneira na qual íons metálicos polivalentes são ligados a compostos orgânicos naturais ou sintéticos.

Para a formação dos quelatos, podem-se utilizar diversas moléculas como ligantes que têm função específica no metabolismo. Elas são de baixo peso molecular e a capacidade oxidativa ou "ligante" depende do tamanho da molécula e da presença de radicais carboxílicos.

Normalmente, um cátion polivalente (mineral) pode fazer a ligação com uma, duas ou várias dessas moléculas, para formar um "composto mineral organicamente ligado" ou quelato, podendo assim ser vendido como fonte de mineral.

Pelo fato dos aminoácidos serem bioquimicamente importantes e serem aptos a formar anéis de cinco ou seis membros, eles também são utilizados como ligantes quelantes para metais (ver Figura 2)²⁴, pois contêm, entre outros, grupos terminais amina e carboxílico que favorecem a formação do quelato⁸.

Figura 2 – Aminoácidos como quelantes de metais.



Fonte: Núcleo de Pesquisas Aplicadas²⁴

Nos anos 60, Ralph Pearson, introduziu o conceito de ácidos e bases duros e moles. Assim, um ácido duro é um íon metálico do tipo Al(III), Co(III), In(III), e uma base dura é um grupo do tipo amônia ou o íon cloreto. Um ácido mole é um íon metálico do tipo Co(II), Zn(II), Ag(I) e uma base mole é um grupo do tipo fosfina ou o íon iodeto. Deve-se notar que espécies duras, tanto ácidos como bases, tendem a ser espécies pequenas, pouco polarizáveis e que os ácidos e bases moles tendem a ser grandes e mais polarizáveis. Pearson sugeriu uma regra simples (chamada princípio de Pearson) para a predição da estabilidade de complexos formados entre ácidos e bases: ácidos duros preferem se ligar a bases duras enquanto que ácidos

moles preferem se ligar a bases moles. Esta afirmativa não é uma explicação nem uma teoria, mas uma simples regra prática que nos permite prever qualitativamente a estabilidade relativa de complexos e adutos de ácido-base.

De acordo com a Figura 2, o aminoácido coordenado ao metal é a glicina por apresentar o átomo de hidrogênio como o grupo R. A glicina é uma base dura e o átomo de nitrogênio do grupo amino ($-NH_2$) e o átomo de oxigênio presente no grupo carboxilato ($-COO^-$) tendem a se coordenar a ácidos duros, como por exemplo o Co(III). Na medida em que o grupo R presente nos aminoácidos torna-se mais volumoso, faz com que estas bases duras se amoleçam, preferindo portanto, se coordenar a ácidos moles, como por exemplo, Co(II) e Zn(II).

Em geral, minerais quelatados mostram biodisponibilidade maior ou igual àquelas na forma de sulfato ou óxido. Para a utilização mais efetiva desses materiais quelatados, são necessárias mais informações a respeito de sua composição, absorção e metabolismo no tecido na qual define sua disponibilidade biológica.

1.4 Aminoácidos como ligantes para formação de quelatos

As proteínas são polímeros formados pela união de vários aminoácidos, sendo que cada resíduo de aminoácido liga-se a seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (ligação peptídica). As proteínas podem ser reduzidas a seus aminoácidos constituintes, ou seja, podem ser hidrolisadas, por uma variedade de métodos.¹²

Dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, 19 são α -aminoácidos enquanto que a prolina é um iminoácido. Isso porque a prolina apresenta um grupo carboxila e um grupo imino ligados ao mesmo átomo de carbono enquanto que os 19 α -aminoácidos apresentam um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao átomo de carbono α . Os aminoácidos diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água.¹²

Os aminoácidos podem se coordenar aos metais de transição como ligantes bi-, tri- ou tetradentados, através dos átomos de nitrogênio, oxigênio e/ou enxofre como doadores de elétrons.

Cabe destacar que tem havido nos últimos anos um resgate do interesse no estudo de complexos de metais de transição contendo aminoácidos como metionina, lisina, alanina, fenilalanina e triptofano.^{25;26}

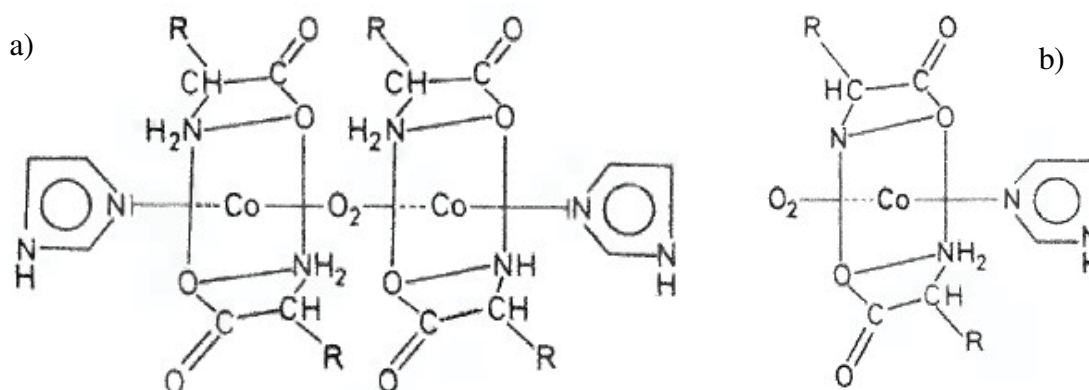
1.5 Propriedades físico-químicas, biológicas e nutricionais de complexos metálicos contendo aminoácidos e dipeptídeos

Destacamos que há na literatura diversos trabalhos a respeito deste tema e, à título de ilustração, podemos destacar o trabalho de Neville²⁷ que demonstra que complexos de cobalto (II) com cisteína, de coloração verde-oliva, se tornam rosa na presença de grandes quantidades deste aminoácido e, que se oxidam rapidamente na presença de oxigênio, transformando-se em complexos de Co(III) de coloração marrom escuro.

Os metais de transição, tais como, cobalto, ferro e cobre são conhecidos por desempenhar papéis importantes em muitos processos biológicos, tais como a formação e rompimento de ligações químicas, transferência de carga, transferência de oxigênio, fixação de nitrogênio e fotossíntese. Os centros ativos são cercados por proteínas de alto peso molecular que os protegem e, o papel essencial no processo de fixação do oxigênio nestes sistemas é desempenhado pelo ferro (II), coordenado ao grupo imidazol de histidina penta coordenado.¹⁰

Muitos complexos sintéticos que carregam oxigênio reversivelmente podem ser divididos em dois grupos: aqueles que fixam oxigênio em ponte, de forma dimérica, e aqueles que fixam na forma monomérica como nos sistemas naturais, como é o caso do íon cobalto(III), conforme ilustra a Figura 3.

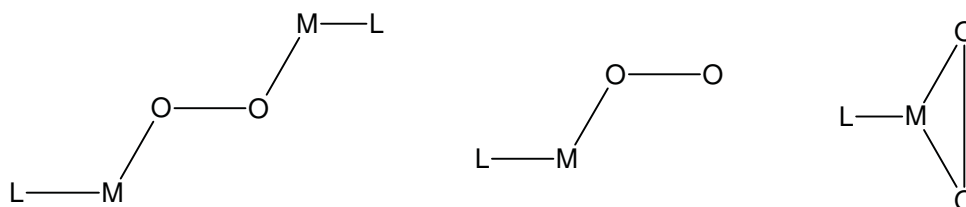
Figura 3. Estruturas propostas para as espécies dimérica (a) e monomérica (b) do Co(III).



Fonte: Jezowska, B. (1974, p. 373).

Conforme mostrado na Figura 4, a coordenação do oxigênio ao íon metálico pode ser classificada em três grupos, de acordo com a geometria da molécula em torno do íon metálico.¹⁰

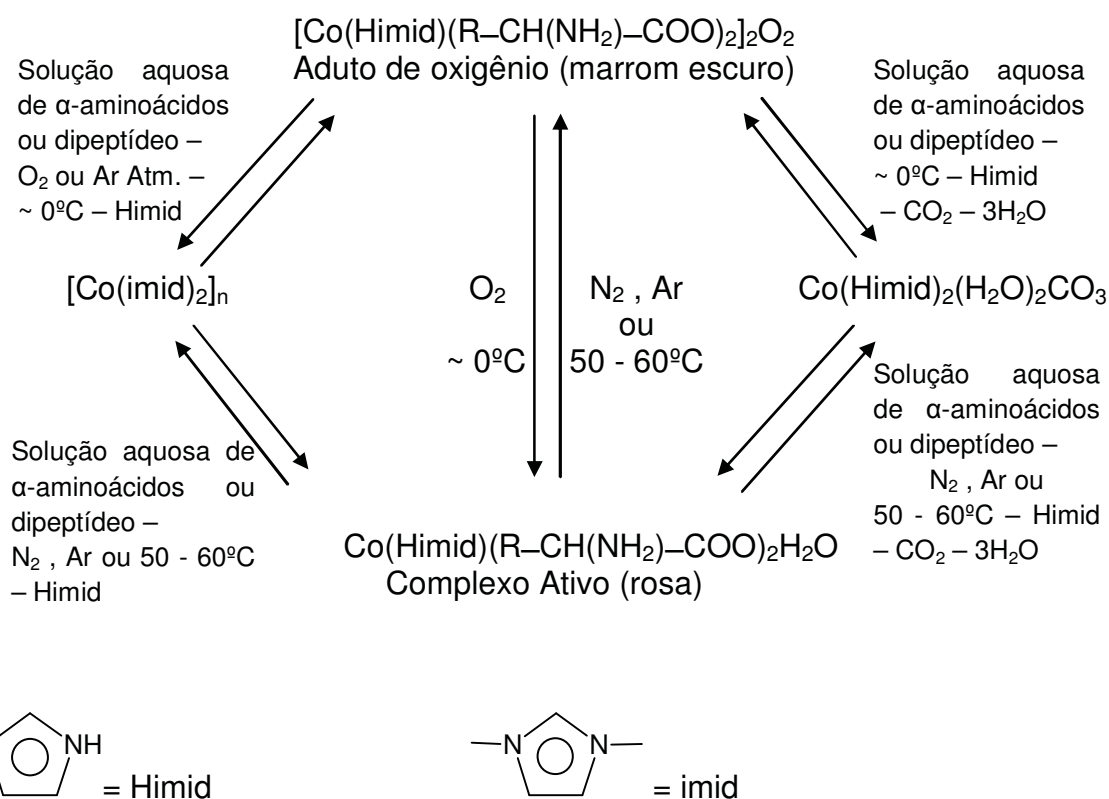
Figura 4 – Modos de coordenação do oxigênio ao íon metálico.



Fonte: Jezowska, B. (1974, p. 369) – Adaptada pelo autor.

Complexos de cobalto(II) em solução aquosa com aminoácidos ou dipeptídeos contendo imidazol, e na presença de oxigênio a 0 °C, formam adutos de oxigênio de coloração marrom escuro. Por outro lado, em atmosfera inerte de N₂ ou Argônio e na temperatura de 50 – 60 °C observa-se a formação de um complexo ativo de coloração rosa. A Figura 5 ilustra o que ocorre.¹⁰

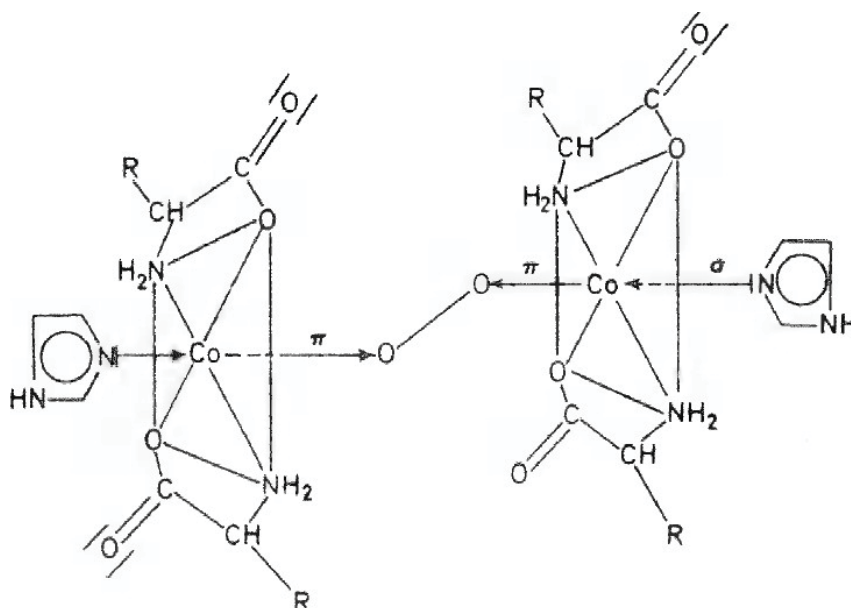
Figura 5 - Esquema das reações de formação dos complexos ativos e adutos oxigenados.



Fonte: Jezowska, B. (1974, p. 370) – Adaptada pelo autor.

Dentre os adutos de oxigênio em solução, predomina aquele da forma μ -peróxido em ponte, na qual o íon cobalto se encontra na forma de Co(III), conforme representado na Figura 6.¹⁰ Uma forma simples de ver a ligação da molécula de O₂ ao íon metálico de cobalto é tratar o par isolado do átomo de oxigênio como uma base de Lewis σ (um doador de par de elétrons) e o orbital antiligante vazio do O₂ como ácido de Lewis π (um receptor de par de elétrons), o qual recebe densidade eletrônica π dos orbitais d ocupados do átomo metálico. Desta forma, a ligação pode ser considerada como composta de duas partes: uma ligação σ (fraca) do ligante para o átomo metálico e uma ligação π (forte) do átomo metálico para o ligante, onde este tipo de ligação π é algumas vezes chamado de retroligação π , na qual confere estabilidade a essas ligações.

Figura 6 - Estrutura proposta para o dímero em solução.



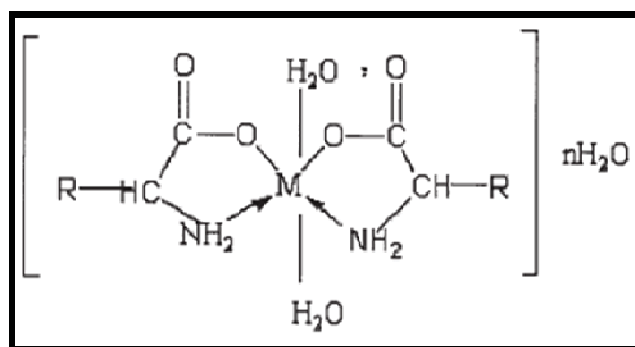
Fonte: Jezowska, B. (1974, p. 371).

Gilbert, Otey e Price²⁸ apontaram que alguns complexos de Co(II) formados com alguns dipeptídeos, tais como complexos de glicilglicina e peptídeos de histidina de coloração amarelo-marrom são irreversivelmente reduzidos para a coloração rosa.

Joshi et al.²⁹ reportaram a síntese de complexos de Co(II) formados pelos aminoácidos glicina, alanina, valina e ácido glutâmico. Também Rusu et al.³⁰

sintetizaram e caracterizaram três complexos de Co(II) (ver Figura 7)³⁰ contendo os aminoácidos lisina, leucina e metionina. Neste trabalho, foi investigada a atividade tóxica destes compostos frente a culturas de células de *Sacharomices cerevisiae* e *Candida albicans*. Estes complexos de Co(II) foram ativos frente às células *S. cerevisiae* e *C. albicans*, e em especial aquele contendo metionina que apresentou um resultado melhor frente aos fungos testados. Os espectros vibracionais no infravermelho dos complexos mostraram que os aminoácidos atuam como ligantes bidentados coordenados via átomo de oxigênio carboxílico presentes no grupo carboxílico e via átomo de nitrogênio presente no grupo amino.

Figura 7 - Fórmula molecular proposta para os complexos de Co (II) contendo aminoácidos.



M = Co²⁺

R = - (CH₂)₄-NH₂ para Co-lisina

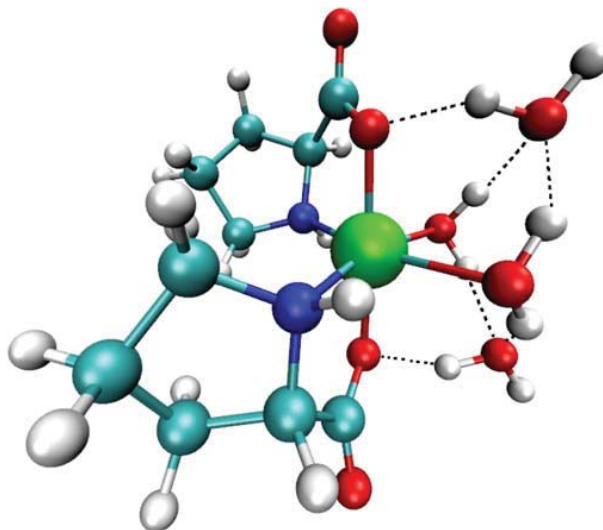
R = - (CH₂)₄ para Co-leucina

R = - (CH₂)₂-S-CH₃ para Co-metionina

Fonte: Rusu et al. (2009, p. 943).

De acordo com Damaj et al.³¹, foram também preparados complexos de Co (II) contendo prolina e estudos preliminares indicaram a possibilidade de uso desses compostos como sequestradores de oxigênio em filmes plásticos para embalagens. Baseado na análise elementar, ICP-AES e FTIR, confirmou-se a formação de um complexo octaédrico de fórmula mínima [Co(L-prolina)₂(H₂O)₂], como mostra a Figura 8.

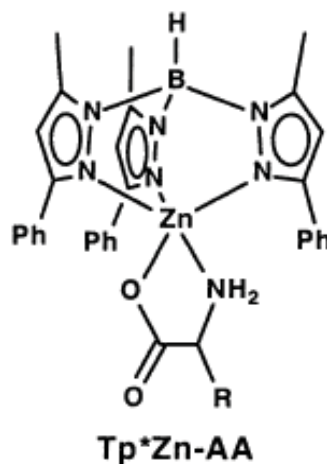
Figura 8 - Estrutura octaédrica levemente distorcida da amostra $[\text{Co}(\text{II})(\text{L-prolina})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.



Fonte: Damaj et al (2009, p.18).

Importante destacar que a literatura mais recente tem reportado a preparação de *Metal Organic Frameworks*, materiais extremamente porosos cuja sigla é *MOFs*, de cobalto(II) com aminoácidos a partir de síntese hidrotérmica.³²

Com relação aos sistemas de zinco/aminoácidos reportados na literatura, o trabalho de Rombach et al.³³ relata que até o ano de 2002, apenas oito complexos de aminoácidos contendo Zn(II) tinham tido suas estruturas cristalinas determinadas, sendo eles: $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$, $[\text{Zn}(\text{Leu})_2]$, $[\text{Zn}(\text{Cys})_2]^{2-}$, $[\text{Zn}(\text{Met})_2]$, $[\text{Zn}(\text{His})_2]$, $[\text{Zn}(\text{Ser})_2]$, $[\text{Zn}(\text{Asp})(\text{H}_2\text{O})_2]$ e $[\text{Zn}(\text{Glu})(\text{H}_2\text{O})]$. Para os aminoácidos que não apresentam cadeia lateral capaz de se coordenar ao zinco, espera-se que se coordenem pelo grupo carboxilato. Eles se ligam a unidade do pirazolilborato de zinco (Tp^*Zn) pela simples reação de condensação do ácido carboxílico com o $\text{Tp}^*\text{Zn}-\text{OH}$. Isto é verificado (Figura 9) para os aminoácidos glicina, valina, leucina, metionina, fenilalanina e triptofano para produzir facilmente complexos e bons rendimentos.³³

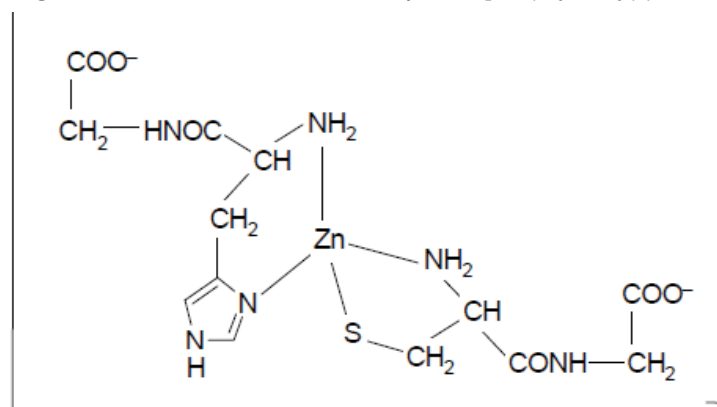
Figura 9 - Estrutura do complexo Tp*Zn-AA.

Fonte: Rombach et al (2002, p. 27).

Além disto, eles também sintetizaram complexos utilizando dipeptídeos, bloqueando todas as suas funções doadoras por meio de grupos protetores, exceto o grupo ácido carboxílico terminal. Os peptídeos com os possíveis grupamentos reativos protegidos utilizados foram os Boc-fenilalanil-glicina (GlyPheBoc) e α -aspartil-fenilalanina-metilester (AspPheOMe), aos quais se coordenaram à unidade Tp*Zn através do grupo carboxilato, resultando nos complexos Tp*Zn-Pept. (Pept= GlyPheBoc e AspPheOMe). Estas coordenações são muito variáveis, podendo ser de três tipos: monodentada, semibidentada e bidentada.³³

Complexos de Zn(II) com os aminoácidos tirosina, triptofano, cisteína, histidina e alanina formam suspensões para administração parenteral e são pouco solúveis. Exemplos de tal formulação de um medicamento são as suspensões de insulina, corticotropina e hirudina, em combinação com Zn(II).³⁴

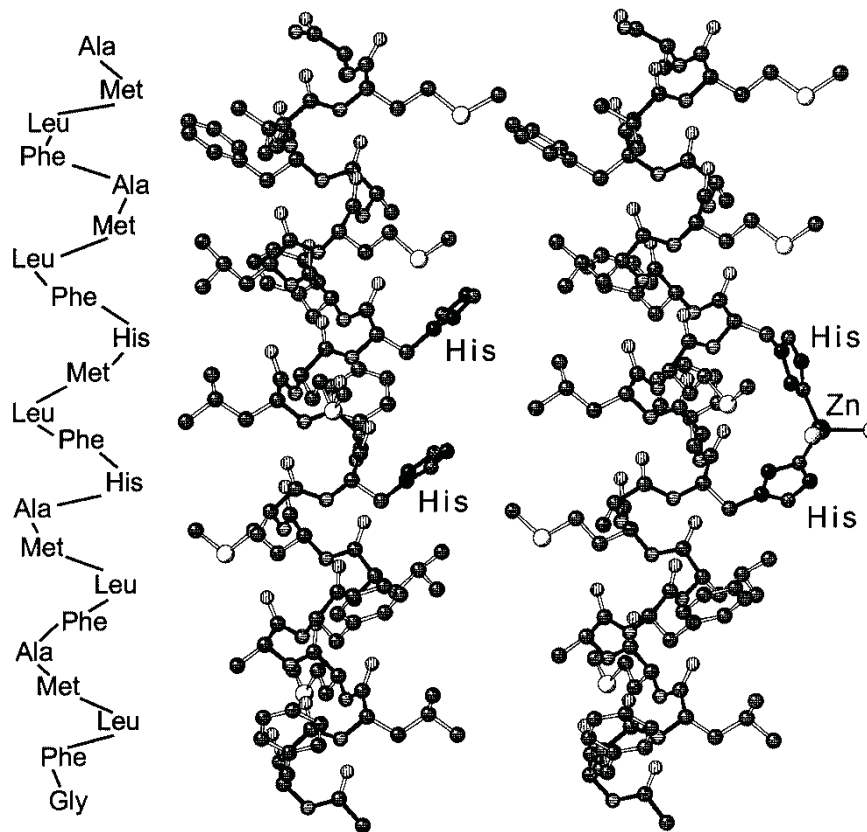
Interações do zinco e cobalto com dipeptídeos (cisteinaglicina e histidinaglicina) interagindo com o DNA foram estudados por REDDY, RADHIKA e SRINIVAS RAO³⁵. Identificaram que apenas os complexos de zinco têm a capacidade de se ligar ao DNA em comparação com os de cobalto. Através dos dados experimentais realizados, eles propuseram a geometria tetraédrica para os íons destes metais e a estrutura mostrada na Figura 10.

Figura 10 - Geometria do complexo [Zn(CysGly)(HisGly)].

Fonte: Reddy, P. R. (2004, p. 224).

No trabalho de Gelinsky e Vahrenkamp³⁶, complexos de zinco contendo 22 peptídeos na forma helicoidal foram obtidos em meio não polar. O tratamento com sais de zinco produziram dois complexos moleculares, [(P22)ZnCl₂] e [(P22)ZnI₂], que foram os primeiros complexos metálicos contendo peptídeos de tamanhos médios a serem isolados em um estado analiticamente puro e identificados por espectrometria de massa. A forma helicoidal do peptídeo livre e de seus complexos foi confirmada por espectroscopia vibracional no infravermelho e dicroísmo circular, bem como por cálculos de mecânica molecular. As estruturas propostas para estes compostos de zinco, assim como para o peptídeo livre, estão apresentadas na Figura 11.

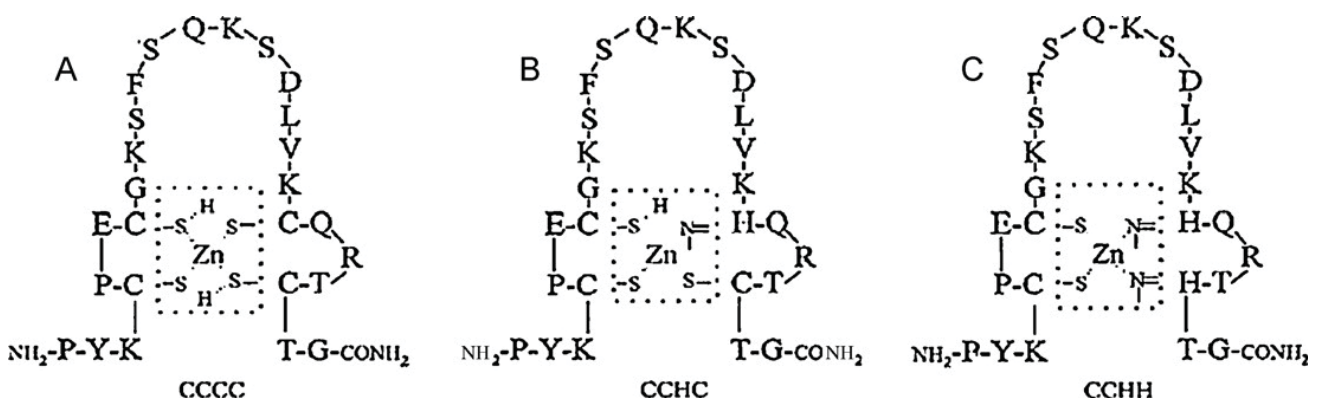
Figura 11 - Estrutura computadorizada do peptídeo P22 (à esquerda) e seu complexo de zinco (à direita).



Fonte: Gelinsky, M. e Vahrenkamp, H. (2002, p. 2460).

Estes complexos são modelos viáveis para mimetizar as ligações do zinco nas proteínas do tipo *dedos de zinco*, conforme mostra a Figura 12.

Figura 12 - Representações do zinco coordenado tetraédricamente nas três espécies nativas das proteínas do tipo *dedos de zinco*: (A) Cys₄, (B) Cys₃His, (C) Cys₂His₂.



Fonte: Doug D. Carlton Jr e Kevin A. Schug, (2011, p. 26).

1.6 O soro do leite

1.6.1 O leite e sua composição

O leite é uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis, enquanto que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, por micelas de caseína e glóbulos de gordura. O leite é composto de 87,3% de água e 12,7% de sólidos totais, assim distribuídos: proteínas totais (3,3-3,5%); gordura (3,5-3,8%); lactose (4,9%); além de minerais (0,7%) e vitaminas.³⁷

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento.

Do ponto de vista nutricional e industrial, as caseínas são as proteínas de mais ampla aplicação e valor econômico, utilizadas para a produção de queijos e seus derivados pelas indústrias de laticínios.³⁷

1.6.2 Principais proteínas do soro do leite e seu valor nutricional

Segundo Kosikowski³⁸, o soro do leite, porção aquosa do leite que durante a fabricação convencional de queijos ou da caseína se separa, é responsável por cerca de 85-95% do volume do leite, retendo 55% dos seus nutrientes.

As proteínas remanescentes no soro do leite são: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina sérica bovina, imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima que apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo.³⁷

A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro de leite bovino; no entanto, todas as proteínas presentes no soro do leite são alergênicas, podendo causar alergias em segmentos mais sensíveis da população, principalmente crianças.³⁷

As concentrações em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e as porcentagens médias das proteínas no soro do leite estão compiladas na Tabela 2.^{37;39}

Tabela 2 - Concentração e porcentagens das principais proteínas do soro do leite.

Proteínas do soro	g·L ⁻¹	Porcentagens médias (%)
β-lactoglobulina	3,2	45 – 57
α-lactalbumina	1,2	15 – 25
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	10
Imunoglobulinas	0,7	-
Lactoferrina	0,1	-
Lisozima	Desprezível	-

Fonte: Sgarbieri, V. C. (2005, p. 49).

1.6.3 Soro do leite: uma questão ambiental

No processo de fabricação de queijos são produzidos mundialmente cerca de 100 bilhões de litros de soro ao ano⁴⁰ e quase metade desta produção era descartada nos rios sem nenhum tratamento prévio. Contudo, felizmente, essa questão já avançou consideravelmente, fazendo com que a legislação ambiental se tornasse mais restritiva. O soro de leite, quando descartado como resíduo líquido industrial e despejado junto com os outros resíduos líquidos das indústrias de laticínios, pode significar a duplicação do sistema de tratamento, pois possui DBO entre 25.000 e 80.000 mg O₂ /L.⁴¹

O seu alto grau de poluição compromete a estrutura físico-química dos solos, polui as águas, além de destruir a flora e a fauna⁴². Tal índice é aproximadamente 100 vezes maior que o de um esgoto doméstico e, considerando uma produção média de 10.000 L de soro por dia, esta teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5.000 habitantes.⁴³

Buscar alternativas para um aproveitamento adequado do soro de leite é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do seu volume e de seu poder poluente.⁴¹ Cada vez mais, portanto, a legislação ambiental exige das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro.⁴³

Portanto, na tentativa de aproveitar esse material de alto valor biológico bem como contribuir para a diminuição do problema ambiental causado pelo descarte indevido desse resíduo, hoje em dia o soro do leite é coletado e utilizado em muitos produtos de altíssimo valor agregado como biscoitos, suplementos alimentares ou medicamentos.⁴²

1.6.4 Soro do leite – fonte natural de ligantes

Pacheco et al.⁴⁴ realizaram a hidrólise das proteínas do soro do leite utilizando pancreatina. As proteínas do soro do leite, hidrolisadas pelo sistema pancreatina num grau de hidrólise de 20%, apresentam, aproximadamente, 90% do seu conteúdo constituído por peptídeos com peso molecular inferior a 1kDa.

A composição completa dos aminoácidos contidos no hidrolisado do soro do leite encontra-se na Tabela 3. Verifica-se que os quatro aminoácidos preponderantes foram o ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina e lisina.

Tabela 3 - Composição em aminoácidos do hidrolisado do soro do leite.

Aminoácidos	Quantidade presente no soro hidrolisado (g/100g de proteína)
Asp	10,50
Thr	6,88
Ser	5,53
Glu	17,81
Pro	5,97
Gly	1,79
Ala	4,75
Cys	2,45
Val	5,42
Met	2,46
Ile	5,69
Leu	10,55
Tyr	3,14
Phe	3,44
Lys	9,97
His	2,54
Arg	1,56

Fonte: Pacheco, M. T. B. (2006, p. 51).

A ideia do trabalho seria, então, realizar a hidrólise enzimática das proteínas presentes no soro do leite e, que dependendo do tipo de enzimas e condições adotadas na hidrólise obtêm hidrolisado proteico diferentes com alta capacidade coordenante frente a centros metálicos bioativos. Como o hidrolisado proteico é uma

mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos logo diversos compostos de coordenação podem ser obtidos e sua caracterização completa é portanto difícil de ser alcançada.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos principais:

- Realizar a hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite para a obtenção de ligantes de origem natural;
- Investigar a interação dos íons metálicos Co(II) e Zn(II) com os aminoácidos e pequenos peptídeos provenientes da hidrólise das proteínas do soro do leite, visando preparar quelatos metálicos a serem utilizados posteriormente como suplementação alimentar.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes utilizados

Os reagentes (p.a.) foram utilizados sem purificação prévia. Os solventes (p.a.) empregados nas reações foram tratados com peneira molecular e armazenados em frascos de vidro escuro e estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes e solventes utilizados.

PROCEDÊNCIA	NOMES REAGENTES E SOLVENTES
Aldrich	Dimetilsulfóxido, nitrato de cobalto(II) hexahidratado
Amersham Biociences GE.	Kit com marcadores de massa molecular
Cooperativa de Laticínios São Carlos	Leite B
Estrela	Renina comercial de <i>Aspergillus Níger</i>
Hoester	Membranas de diálise
Indukern	Nitrato de zinco hexaidratado, sulfato de cobalto(II)heptahidratado
J.T.Backer	Ácido clorídrico e ácido nítrico
Merck	Acetato de amônio, ácido ascórbico, acrilamida, bisacrilamida, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto(II) hexahidratado, cloreto de zinco, dimetilformamida (DMF), etanol
Novo Nordisk	hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, pepsina, persulfato de amônio, tetra-hidrofurano, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e alaranjado de xilenol.
Nujol	Carboxipeptidase, tripsina
Reagen	Óleo mineral
	Caulin

Riedel	Lactose
Sigma	Comassie brilliant blue, DMSO, dodecil sulfato de sódio (SDS), quimotripsina, resinas para cromatografia de troca iônica DEAE-Trysacril e de separação Sephadex G -25, soro albumina bovina, tartarato de sódio-potássio, temed.
Sigma-Aldrich	Ácido 3-5´dinitrosalicílico (DNS), ácido tricloroacético, carbonato de sódio, extrato biliar, folin-ciocalteau, pancreatina
Synth	Ácido acético, metanol.
Tedia	Metanol
Vetec	Tris-HCl

Fonte: Elaborada pelo autor.*

3.2 Equipamentos

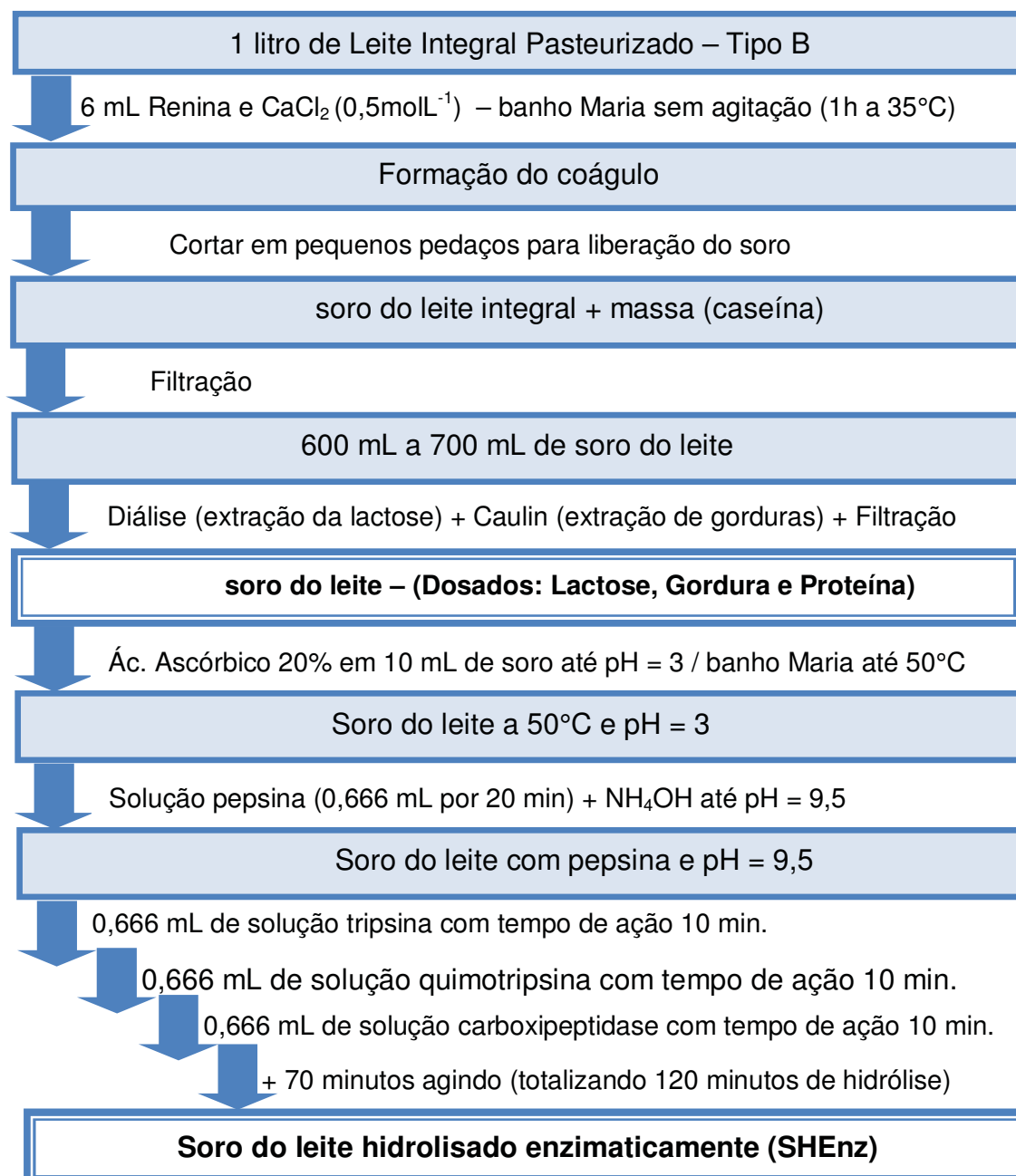
Centrífuga refrigerada (Eppendorf); Ponto de Fusão (Microquímica MQAPF-301); ELEMENTAR ANALYZER CHN (Perkin-Elmer 2400); TA-Instruments (SDT Q600); Centrífuga (Fanem Excelsa Baby II Modelo 206-R); Difrátômetro Siemens D-5000; Banho Maria, com agitação e aquecimento Dubnoff (Marconi); pHmetro (Micronal B-374); Espectrofotômetro (Nicolet Impact 400) e Coletor de Frações LKB- FRAC-200 (Amersham Biociences GE); Bomba de Vácuo adaptada pelo Cemeq-Unesp; Cuba para eletroforese em acrílico com eletrodos adaptados (Sigma-Aldrich); Fonte de eletroforese 0-500 volts e de 0-250 mA (Amersham Biociences GE) e Cromatógrafo (Varian ProStar), composto por duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/ Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, controlado por uma Workstation para manipulação e tratamento dos dados, Liofilizador L101 da marca Liotop; Sistema HPLC Shimadzu LC-10A/C-47 A, equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A; Potenciostato - AUTOLAB Type III; Estufa de esterilização e secagem com circulação e renovação de ar (MSM 512/80/RP) da marca MS MISTURA.

* As tabelas de 4 a 45 foram elaboradas pelo autor.

3.3 Soro do leite

3.3.1 Obtenção do soro do leite hidrolisado.⁴²

O fluxograma a seguir representa todas as etapas desenvolvidas para a obtenção do soro do leite hidrolisado enzimaticamente (**SHEnz**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2 Liofilização do soro do leite hidrolisado

Após a obtenção do soro do leite hidrolisado, optou-se por fazer a sua liofilização para que fosse obtido no estado sólido (**SLHEnz**). Para tal fim, foi utilizado o Liofilizador L101 da marca Liotop, a uma temperatura de - 30 °C, obtendo o **SLHEnz** sólido conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Liofilizador L101 e Soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente.



Fonte: Elaborada pelo autor*.

Optou-se nesse trabalho pela produção do **SLHEnz**, mas o mesmo poderia ter sido comprado sob a forma de isolado proteico do soro do leite. O aspecto amarelado do **SLHEnz** obtido nesse trabalho se deve provavelmente à reação de Maillard ocorrida com a lactose residual ainda presente no **SLHEnz**. O isolado proteico comercial, por outro lado, apresenta um aspecto tendendo ao branco.

3.3.3 Análises

No soro do leite foram realizadas dosagens de proteínas^{45;46}, lactose⁴⁷ e gorduras⁴⁸, enquanto que no soro do leite hidrolisado enzimaticamente foram obtidos aminogramas⁴⁹ e efetuadas eletroforeses SDS-PAGE⁵⁰ em gel de poliacrilamida (concentração 12%) para avaliar a extensão da hidrólise. Detalhamento experimental a seguir nos itens Métodos Instrumentais, Resultados e Discussão.

* As figuras de 14 a 45 foram elaboradas pelo autor.

3.4 Síntese das amostras de cobalto e zinco

3.4.1 Precursores

Na realização das sínteses foram utilizados cinco precursores, sendo estes: cloreto de cobalto(II) hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de cobalto(II) hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de cobalto(II) heptahidratado ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de zinco (ZnCl_2) e nitrato de zinco hexahidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

3.4.2 Rotas de síntese

Foram adotadas duas rotas de síntese para a obtenção das amostras, uma delas a pressão ambiente chamada de convencional e a outra síntese hidrotérmica.

Na rota de síntese convencional, a mistura reacional contendo o soro liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (SLHE_{enz}) mais o precursor na temperatura e pH desejados, são mantidos sobre agitação magnética dentro de um béquer, conforme mostra a Figura 14.

Na síntese hidrotérmica, a mistura reacional é mantida dentro um copo de teflon que é inserido em um reator metálico e colocado no interior de uma estufa de esterilização e secagem com circulação e renovação de ar onde permanece por tempo e temperatura controlados (Figura 15). Com o término da reação, o meio reacional é retirado e filtrado à vácuo. Se algum sólido é formado, este é lavado com um solvente adequado e seco ao ar. Quanto ao filtrado, o mesmo é recolhido e mantido em repouso sobre a bancada na tentativa de crescimento de monocristais.

Figura 14 - Esquema da rota de síntese convencional.

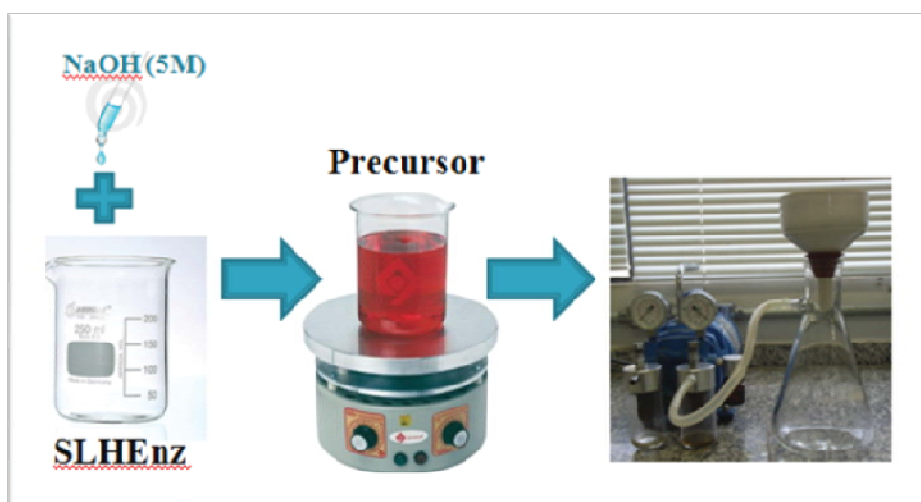


Figura 15 - Copo de teflon e reator metálico utilizado na síntese hidrotérmica.



3.4.3 Amostras Sintetizadas

3.4.3.1 Amostras de Cobalto

3.4.3.1.1 Amostra A

A amostra **A**, de cor rosa claro, foi obtida através de oito sínteses diferentes, sendo estas, quatro pela rota de síntese convencional (sínteses **C₁**, **C_{5B}**, **N₁**, **N₂**) e quatro pela síntese hidrotérmica (**HT-C₁**, **HT-C₂**, **HT-C₃** e **HT-C₄**).

A síntese **C₁** foi realizada adotando o seguinte procedimento: a um volume de 10 mL de uma solução aquosa de cor amarela contendo 0,282 g do soro hidrolisado enzimaticamente e liofilizado (SLHEnz), foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ até pH 11. Em seguida, a solução resultante foi gotejada sobre 5 mL de uma solução aquosa contendo 0,152 g de cloreto de cobalto(II) hexaidratado (CoCl₂·6H₂O), a temperatura ambiente (25 °C). A mistura de cor vermelha obtida, que foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos, levou a amostra **A** de cor rosa, que foi isolado por filtração a vácuo, lavado com água e etanol gelado e posteriormente seco ao ar na temperatura ambiente. A Tabela 5 representa as condições reacionais adotadas na síntese **C₁**.

Tabela 5 - Condições reacionais adotadas pela síntese **C₁**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHEnz (g)	pH	T(°C)	Solvente
C₁	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,152	0,282	11	25	Água

As sínteses **C_{5B}**, **N₁** e **N₂** seguiram o mesmo princípio adotado pela síntese **C₁**, alterando-se o precursor, proporção metal:ligante e solventes. As condições que foram adotadas nestas sínteses estão compiladas na Tabela 6.

A amostra **A** advindo da síntese **C_{5B}** só foi obtida depois de vários dias em que o sobrenadante estava em repouso sobre a bancada, onde o mesmo foi filtrado a vácuo, lavado com etanol gelado e seco ao ar na temperatura ambiente.

Tabela 6 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses **C_{5B}**, **N₁** e **N₂**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHEnz(g)	pH	T(°C)	Solvente
C_{5B}	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,132	11	25	EtOH/DMF
N₁	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,582	0,147	12	25	EtOH/DMF
N₂	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,873	0,199	10	25	água

A síntese **HT-C₁** foi realizada adotando o seguinte procedimento: em um béquer de 50 mL colocou-se 0,147 g de soro hidrolisado enzimaticamente e liofilizado (SLHEnz) e adicionou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ até pH 12,0 e 0,714 g de cloreto de cobalto(II) hexahidratado (CoCl₂·6H₂O), previamente dissolvido em 16 mL de água. A mistura reacional obtida foi, então, transferida para o reator, e submetida a tratamento solvotérmico por 24 h a 90 °C. Após esse tempo, a mesma foi resfriada lentamente até atingir 27 °C a uma taxa de resfriamento igual a 0,1 °C/min. A suspensão vermelha obtida foi filtrada a vácuo, separando traços de um sólido rosa impregnado no papel de filtro, que foi descartado. O sobrenadante, após dias de repouso sobre a bancada, foi filtrado a vácuo, obtendo uma amostra **A** rosa que foi lavada com etanol gelado e seco ao ar na temperatura ambiente.

As sínteses **HT-C₂**, **HT-C₃** e **HT-C₄** seguiram o mesmo princípio adotado pela síntese **HT-C₁**, alterando-se as condições de pH e solventes e as condições adotadas estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses hidrotérmicas **HT-C₁**, **HT-C₂**, **HT-C₃** e **HT-C₄**.

Síntese	Precursor	Metal(g)	SLHEnz(g)	pH	T(°C) /t(h)	Solvente
HT-C₁	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	12	90°C / 24 h	Água
HT-C₂	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	-*	90°C / 24 h	Água
HT-C₃	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	12	90°C / 24 h	EtOH/DMF
HT-C₄	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	-*	90°C / 24 h	EtOH/DMF

* Síntese realizada sem a adição de NaOH.

Os rendimentos das sínteses efetuadas foram determinados e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Rendimento das sínteses realizadas na obtenção da amostra **A**.

Síntese	Rendimento (%)	Síntese	Rendimento (%)
C₁	18	HT-C₁	25
C_{5B}	8	HT-C₂	17
N₁	12	HT-C₃	18
N₂	14	HT-C₄	14

3.4.3.1.2 Amostra B

A amostra **B** de cor rosa escuro foi obtida através de duas sínteses advindas da rota convencional. Estas sínteses foram denominadas **C₂** e **C₃** e seguiram o mesmo princípio adotado pela síntese **C₁**, alterando-se apenas a temperatura. As condições adotadas estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses **C₂** e **C₃**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHEnz(g)	pH	T(°C)	Solvente
C₂	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	11	25	Água
C₃	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,147	11	8	Água

O rendimento das sínteses **C₂** e **C₃** foi de 32% e 18%, respectivamente.

3.4.3.1.3 Amostra C

A amostra **C** de cor roxa foi obtida por duas sínteses advindas da rota convencional. Estas sínteses foram denominadas **C₄** e **C_{5A}** que seguiram o mesmo

princípio adotado pela síntese **C₁**, alterando-se nesse caso o solvente. As condições adotadas nestas sínteses estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses **C₄** e **C_{5A}**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHenz(g)	pH	T(°C)	Solvente
C₄	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,132	11	25	DMF
C_{5A}	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714	0,132	11	25	EtOH/DMF

O rendimento das sínteses **C₄** e **C_{5A}** foi de 13% e 11%, respectivamente.

3.4.3.1.4 Amostra D

A amostra **D** de coloração marrom foi obtida com 23% de rendimento via síntese hidrotérmica denominada **HT-N₂**. Esta síntese seguiu o mesmo princípio adotado pela rota de síntese **HT-C₁**, cujas condições reacionais estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições reacionais adotadas pela síntese hidrotérmica **HT-N₂**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHenz (g)	pH	T(°C)/t(h)	Solvente
HT-N₂	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,457	0,147	-*	90°C / 24 h	EtOH

* Síntese realizada sem a adição de NaOH.

3.4.3.1.5. Amostra E

A amostra **E** de cor rosa salmão foi obtida pela rota convencional denominada **S₁**. Esta síntese seguiu o mesmo princípio adotado pela rota de síntese **C₁**, cujas condições reacionais adotadas estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições reacionais adotadas pela síntese **S₁**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHenz(g)	pH	T(°C)	Solvente
S₁	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,115	0,181	11	6	Água/EtOH

O rendimento da reação para a obtenção da amostra **E** foi de 43%.

3.4.3.2 Amostras de Zinco

3.4.3.2.1 Amostra F

A amostra **F** de cor amarela mostarda foi obtida através de quatro sínteses, sendo estas, duas pela rota de síntese convencional (**Zn-C₅** e **Zn-N₁**) e duas via síntese hidrotérmica (**HT-Zn-N₁** e **HT-Zn-N₃**), cujas condições reacionais estão compiladas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses **Zn-C₅**, **Zn-N₁**, **HT-Zn-N₁** e **HT-Zn-N₃**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHenz (g)	pH	T(°C) / t(h)	Solvente
Zn-C₅	ZnCl ₂	0,409	0,132	12	25 °C	EtOH/DMF
Zn-N₁	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,595	0,132	12	25 °C	EtOH/DMF
HT-Zn-N₁	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,446	0,147	-*	90 °C / 24h	EtOH/DMF
HT-Zn-N₃	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,446	0,147	-*	90 °C / 24h	DMF

* Síntese realizada sem a adição de NaOH.

Os rendimentos das sínteses estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Rendimento das sínteses realizadas na obtenção da amostra **F**.

Síntese	Rendimento (%)
Zn-C₅	10
Zn-N₁	12
HT-Zn-N₁	20
HT-Zn-N₃	10

3.4.3.2.2 Amostra G

A amostra **G** de cor marrom foi obtida pela rota hidrotérmica denominada **HT-Zn-C₁** que seguiu o mesmo princípio adotado pela rota de síntese **HT-C₁**, cujas condições reacionais estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições reacionais adotadas pela síntese **HT-Zn-C₁**.

Precursor	Síntese	SLHenz (g)	Metal (g)	pH	T(°C)/t(h)	Solvente
ZnCl ₂	HT-Zn-C₁	0,147	0,409	11	90 °C / 24 h	Água

O rendimento da reação da amostra **G** foi de 18%.

3.4.3.2.3 Amostra H

A amostra **H** de cor amarela mostarda foi obtida pela rota hidrotérmica denominada **HT-Zn-N₂** que seguiu o mesmo princípio adotado pela rota de síntese **HT-C₁**, cujas condições reacionais estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Condições reacionais adotadas pela síntese **HT-Zn-N₂**.

Precursor	Síntese	SLHEnz (g)	Metal (g)	pH	T(°C)/t(h)	Solvente
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	HT-Zn-N₂	0,147	0,447	-*	90 °C / 24 h	EtOH

* Síntese realizada sem a adição de NaOH.

O rendimento da reação da amostra **H** foi de 15%.

3.4.3.2.4 Amostra I

A amostra **I** de cor amarela mostarda foi obtido pela rota hidrotérmica denominada **HT-Zn-C₃** que seguiu o mesmo princípio adotado pela rota de síntese **HT-C₁**, cujas condições reacionais estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Condições reacionais adotadas pela síntese **HT-Zn-C₃**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHEnz (g)	pH	T(°C) / t(h)	Solvente
HT-Zn-C₃	ZnCl ₂	0,447	0,147	-*	90 °C / 24 h	DMF

* Síntese realizada sem a adição de NaOH.

O rendimento da reação para a obtenção da amostra **I** foi de 13%.

3.4.3.2.5 Amostra J

A amostra **J** de cor amarela mostarda foi obtido por duas sínteses advindas da rota convencional denominadas **Zn-C₁** e **Zn-C₂**.

As sínteses **Zn-C₁** e **Zn-C₂** seguiram o mesmo princípio adotado pela síntese **C₁**, e as condições adotadas nestas sínteses estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Condições reacionais adotadas pelas sínteses **Zn-C₁** e **Zn-C₂**.

Síntese	Precursor	Metal (g)	SLHEnz(g)	pH	T(°C)	Solvente
Zn-C₁	ZnCl ₂	0,136	0,439	10	25	água
Zn-C₂	ZnCl ₂	0,409	0,147	10	25	água

O rendimento das sínteses **Zn-C₁** e **Zn-C₂** foi de 22% e 16%, respectivamente.

4 MÉTODOS INSTRUMENTAIS

4.1 Dosagem de açúcar redutor no soro do leite

A análise do teor de lactose no soro do leite foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Rubens Monti, utilizando o método de Miller.⁴⁷ Os açúcares redutores foram quantificados por espectroscopia com comprimento de onda em 570 nm, utilizando-se uma curva padrão de lactose, cuja concentração variou no intervalo de 1 a 5 mg.mL⁻¹.

4.2 Dosagem de proteínas no soro do leite

A análise de proteínas no soro do leite foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Rubens Monti, utilizando o método Lowry modificado por Hartree.⁴⁶ O método colorimétrico para a estimativa quantitativa das proteínas totais se baseia na mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofre redução das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, histidina, asparagina) quando reage com as proteínas, na presença do catalisador (Cu²⁺), e produz um quelato de cobre com absorção máxima em 750 nm.

4.3 Eletroforese SDS-PAGE

A análise da extensão de hidrólise das proteínas do soro do leite foi realizada no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Rubens Monti, via eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração de 12%)

A eletroforese foi efetuada em condições desnaturantes (SDS-PAGE)⁴⁶ utilizando uma solução tamponada para dissolver a amostra conseguindo a dissociação das proteínas nas suas sub-unidades polipeptídicas utilizando o SDS. A amostra foi desnaturada por aquecimento (cerca de 95 °C durante 10 minutos) com excesso de SDS e reagente tiólico para hidrólise das ligações dissulfeto. O SDS liga-se aos peptídeos segundo uma razão de 1,4 g de SDS por 1,0 g de polipeptídeo deixando-os com cargas negativas e desta forma, todos os complexos SDS-

polipetídeo possuem densidades de carga idênticas e migram no gel em função da sua massa molar. A revelação do gel foi feita utilizando Coomassie blue.

4.4 Aminograma do SLHEnz

A análise de aminoácidos realizada para o soro hidrolisado (**SLHEnz**) foi realizada no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli via método de derivatização pós-coluna com OPA (orto-ftalaldialdeído) em um analisador Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido, e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra. A detecção foi realizada por um detector de fluorescência acoplado ao sistema com comprimento de excitação de 350 nm e comprimento de emissão igual a 450 nm.

A hidrólise ácida foi feita utilizando 1 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ e 80 mL de uma solução de 5 % de fenol em água, durante 72 h a 110°C, após 1 minuto de atmosfera inerte (N₂). Após este período, as amostras foram secas utilizando-se um condensador e uma bomba de vácuo. O material seco foi dissolvido em solução tampão de citrato de sódio 0,2 mol L⁻¹ em pH 2,2. O volume utilizado foi calculado de acordo com a massa de **SLHEnz** (1 mg:1 mL). Esta solução foi filtrada em uma unidade filtrante GV Millex – Millipore e posteriormente injetada no analisador de aminoácidos previamente calibrado com um padrão que permite relacionar as áreas dos picos obtidos e os seus respectivos tempos de retenção, com a concentração e o tipo de aminoácido, respectivamente.

4.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Spectrometer Spectrum2000 (4000 – 400 cm⁻¹) da Perkin Elmer, com resolução de 4 cm⁻¹, usando pastilhas de KBr pertencente ao IQ-UNESP-Araraquara.

4.6 Análise do Teor de Cobalto e Zinco via Complexometria com EDTA⁵¹

Para a análise do teor de cobalto, foram pesados 5 mg da amostra, em uma balança com incerteza de 0,01mg. A amostra foi aberta pela adição de cinco gotas

de solução aquosa de HNO_3 (70 % m/m) a quente. Após resfriamento, adicionou-se 1mL de solução tampão de acetato de amônio $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e, em seguida, um excesso conhecido de solução de EDTA, suficiente para complexar todo o metal presente na amostra. Seguiu-se o ajuste do pH para 5,0 ($\pm 0,1$) e a adição do indicador alaranjado de xilenol, em quantidade suficiente para observar a cor amarela. Em seguida, a mesma foi titulada com solução de ZnCl_2 $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, previamente padronizada com EDTA. A viragem é observada pelo aparecimento de cor rosa.

O teor de metal é calculado pela seguinte fórmula (1):

$$T_{\text{metal}} = M_{\text{metal}} \cdot \frac{(C_{\text{EDTA}} \cdot V_{\text{EDTA}} - C_{\text{ZnCl}_2} \cdot V_{\text{ZnCl}_2})}{m_{\text{composto}} \cdot 100} \quad (1)$$

onde:

T_{metal} = porcentagem de metal na amostra; M_{metal} = massa molar do metal; C_{EDTA} = concentração do EDTA utilizado; V_{EDTA} = volume de EDTA utilizado; C_{ZnCl_2} = concentração do cloreto de zinco utilizado; V_{ZnCl_2} = volume de cloreto de zinco gasto na titulação; m_{amostra} = massa medida da amostra utilizada na titulação.

4.7 Análise Elementar

As análises quantitativas de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuadas pela Central Analítica do IQ/USP-SP usando um ELEMENTAR ANALYZER CHN 2400 da Perkin-Elmer.

4.8 Determinação do Intervalo de Decomposição.

As medidas do intervalo de decomposição das amostras foram realizadas no Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, utilizando o aparelho MAPFQ-301 da Microquímica.

4.9 Termogravimetria (TG) – Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas TG-DTA foram realizadas na UNIFAL / Alfenas – MG, pelo Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida, usando o equipamento da TA-Instruments modelo SDT Q600 em cadinhos de α -alumina, a uma razão de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob

atmosfera dinâmica de ar sintético com vazão de $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se de 10 a 20 mg de amostra.

4.10 Difractometria de Raios-X: método do Pó

Os difratogramas de raios-X foram obtidos em um difratômetro Siemens D-5000, pertencente ao IQ-UNESP, utilizando a radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). As amostras foram colocadas em suportes de vidro próprios do equipamento e submetidas à radiação ($5^\circ \leq 2\theta \leq 70^\circ$). A identificação foi feita por comparação com base de dados da ASTM.

5 ENSAIO BIOLÓGICO

5.1 Determinação da Atividade Biológica frente ao *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

A determinação da atividade biológica dos complexos de Co(II) e Zn(II) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada empregando a metodologia padronizada por Palomino utilizando o revelador de crescimento bacteriano resazurina. Todas as amostras de cobalto e zinco bem como a isoniazida foram diluídas em DMSO para obter-se soluções de 10000 µg/mL. Posteriormente foram realizadas diluições destas soluções no caldo 7H9 (Middlebrook 7H9) de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 1 a 0,01 µg/mL) e das demais substâncias (de 25 µg/mL a 0,09 µg/mL) – na própria placa. A cepa de MTB H₃₇R_v – ATCC 27294 congelada foi diluída até atingir a concentração de 10⁵ UFC/mL para que no final do experimento se obtivesse a população de 10⁷ UFC/mL. A seguir, 100 µL da diluição de 10⁵ UFC/mL foi inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida, das amostras destes metais e seus coordenantes e no controle positivo. A microplaca foi selada com parafilme e incubada a 37°C. Após sete dias de incubação, foi adicionado 30 µL da resazurina diluída em água estéril por toda placa. A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura visual e a medida da luminescência no SpectraFluor Plus (TECAN®).

A CIM foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa de MTB, ou seja, a menor concentração da amostra de cobalto e zinco e seus coordenantes capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. Cada amostra foi testada em duplicata e o mesmo teste foi repetido três vezes em semanas consecutivas. A determinação da CIM frente ao MTB H₃₇R_v (ATCC 27294) foi realizada em diferentes condições ambientais: normais; pH 6,0; 4% de albumina e 10% de soro fetal bovino

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Dosagem de açúcar redutor no soro do leite ⁵²

Para a dosagem de açúcar redutor, utilizou-se o método de Miller.⁴⁷ A curva de calibração utilizada, para posterior determinação da concentração de açúcar redutor no soro do leite, foi de lactose como apresentada na Figura 16. Foi determinado um coeficiente de extinção molar para a lactose, a partir da curva, igual a $290 \cdot (\text{mol/L})^{-1}$. A Tabela 19 apresenta os valores obtidos nas dosagens.

Figura 16 - Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.

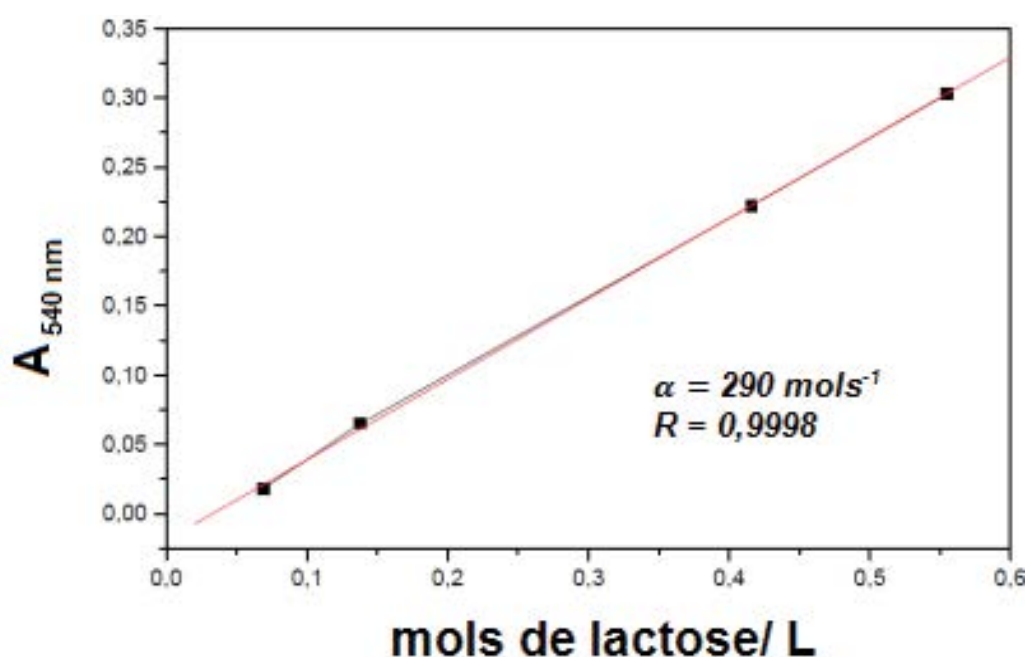


Tabela 19 - Determinação da quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.

Amostras de soro	$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Soro produzido em laboratório puro (sem tratamento)	$1,9 \cdot 10^{-2}$
Soro industrial sem tratamento	$2,7 \cdot 10^{-2}$
Soro produzido em laboratório (dialisado)	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Soro produzido em laboratório (dialisado e filtrado)	$8,0 \cdot 10^{-4}$

As leis de Lambert-Beer são o fundamento da espectroscopia. Elas são tratadas simultaneamente, de maneira que, a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução (caminho óptico).

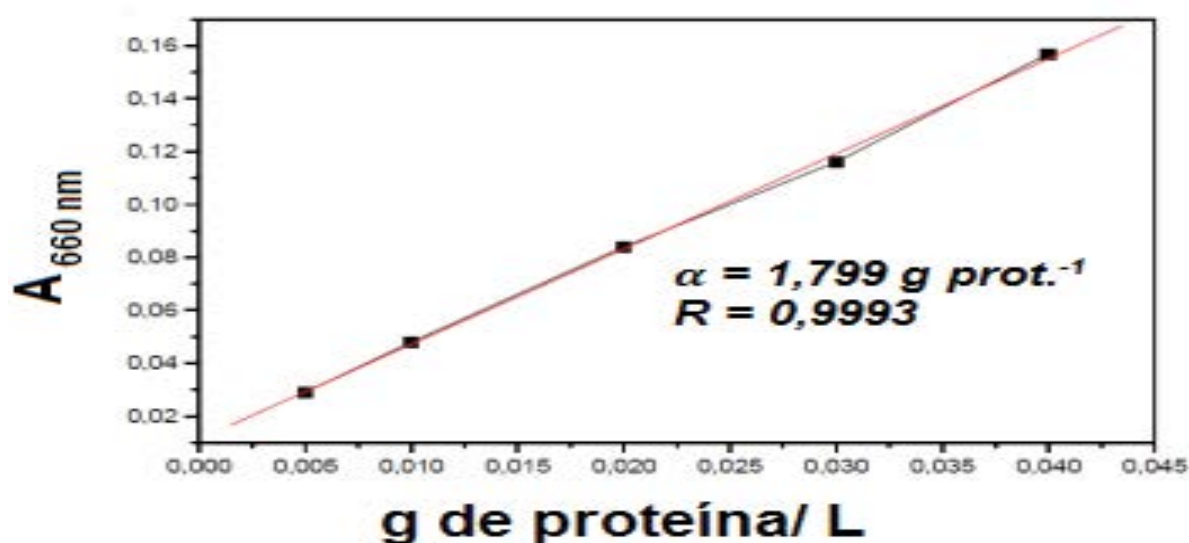
A reta obtida entre os limites de concentração de cada uma das soluções utilizadas, representando uma relação de proporcionalidade entre as absorbâncias e as concentrações das mesmas, obedecendo assim, as Leis de Lambert Beer; além disso, a porção linear englobou a maioria dos pontos, o que garante um bom limite de sensibilidade do método.

Cabe ressaltar que os valores de concentração do açúcar redutor para o soro de leite puro produzido no laboratório podem apresentar diferenças devido a fatores como tipo de leite utilizado, raça do animal, estágio de lactação ou tipo de tratamento sofrido pelo leite. Ainda de acordo com a Tabela 19 pode-se notar que após tratamentos de diálise e filtração, os valores encontrados de açúcar redutor foram bem inferiores, o que significa que os processos de tratamento realizados auxiliaram na retirada de açúcar redutor que é um interferente no método de dosagem de proteínas.

6.2 Dosagem das proteínas⁵²

O método de dosagem de proteínas utilizado neste trabalho, para estimar o conteúdo proteico do soro do leite produzido em laboratório nas várias etapas de processamento (soro puro, soro dialisado e soro dialisado e filtrado), foi o método Lowry modificado por Hartree.⁴⁶ A Figura 17 mostra a curva de calibração da Albumina do Soro Bovino (SBA) utilizada para os cálculos da concentração de proteína. Determinou-se de acordo com a curva, o valor de $1,799 \text{ (g proteína/ L)}^{-1}$ para o coeficiente de extinção.

Figura 17 - Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.



A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos com as dosagens de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

Tabela 20 - Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

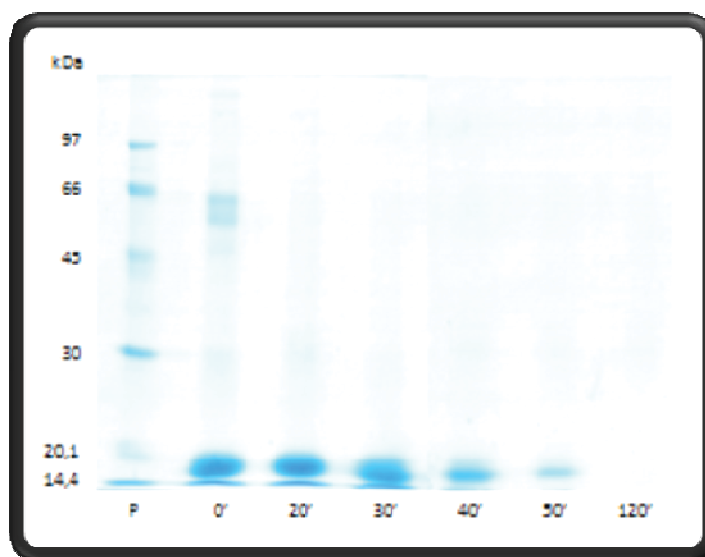
Amostras de soro	g·L ⁻¹
Soro produzido em laboratório (dialisado)	6,99
Soro produzido em laboratório (dialisado / filtrado)	6,18
Soro industrial	6,15

A partir da Tabela 20 notam-se diferenças existentes entre as dosagens de proteínas no soro dialisado e dialisado/filtrado. A quantidade do açúcar redutor foi diminuída após a realização dos tratamentos de diálise e filtração, colaborando dessa forma para a dosagem real da quantidade de proteínas no soro tratado. Além disso, o processo de filtração em Caulim promoveu a retirada de prováveis micelas de caseína não precipitadas que poderiam causar alterações no resultado da dosagem de proteínas.

6.3 Eletroforese do produto de hidrólise enzimática obtido do soro de leite como substrato⁴²

Os resultados obtidos com a eletroforese (Figura 18) revelam que o tempo do ensaio enzimático e as diferentes combinações enzimáticas determinam as proteínas a serem hidrolisadas e o grau de hidrólise. A combinação enzimática que permitiu uma maior hidrólise das proteínas do soro do leite foi realizada pelas quatro enzimas em conjunto (pepsina, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina).

Figura 18 - SDS-PAGE do produto de hidrólise da pepsina, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina utilizando soro do leite como substrato.



Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 20 minutos; coluna 4: 30 minutos; coluna 5: 40 minutos; coluna 6: 50 minutos; coluna 7: 120 minutos de reação

A eletroforese foi executada em gel de poliacrilamida (concentração 12%) e sua atuação é semelhante à de uma peneira molecular, tornando lenta a migração de proteínas na proporção de sua razão entre carga e massa. Tal migração também pode ser afetada pela forma e tamanho das mesmas. A força que move a macromolécula é o potencial elétrico.

Amostras de soro sofrendo a ação enzimática foram retiradas em intervalos de tempo regulares para serem misturadas ao SDS e em seguida transferidas uma a uma para os diversos poços de gel.

A eletroforese empregada foi capaz de separar os polipeptídeos quase que exclusivamente com base em suas massas moleculares, com os menores migrando

mais rapidamente.⁵³ Vale ressaltar que as principais proteínas do soro do leite são a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e albumina sérica bovina (BSA) que apresentam massas molares iguais a 18 kDa, 14 kDa e 69 kDa, respectivamente.

O corante azul Coomassie adicionado ao processo é capaz de interagir especificamente com as proteínas não sendo sensível para aminoácidos e também a peptídeos menores que 3 kDa, o que torna possível o seu monitoramento. A diminuição das bandas visualizadas no gel ao longo do tempo evidencia a efetividade da hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite.

As bandas visualizadas no tempo zero confirmam a presença das proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (14-20 kDa), BSA em 68 kDa, bem como as outras proteínas presentes no soro. A permanência da banda em 20 kDa na banda relativa ao tempo de 30 minutos pode ser atribuída à presença da proteína β -lactoglobulina (18 kDa) que é resistente à ação da pepsina.

A interação entre as proteínas de elevado peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio deste para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Tal absorbância é proporcional à quantidade de corante ligado e consequentemente à concentração dos maiores peptídeos da amostra⁵⁴.

O desaparecimento das bandas no tempo de 120 minutos indicou a ocorrência da hidrólise das proteínas presente no soro do leite.

6.4 Aminograma do SLHEnz

O aminograma do soro hidrolisado enzimaticamente está representado na Figura 19 enquanto que o aminograma padrão segue representado na Figura 20.

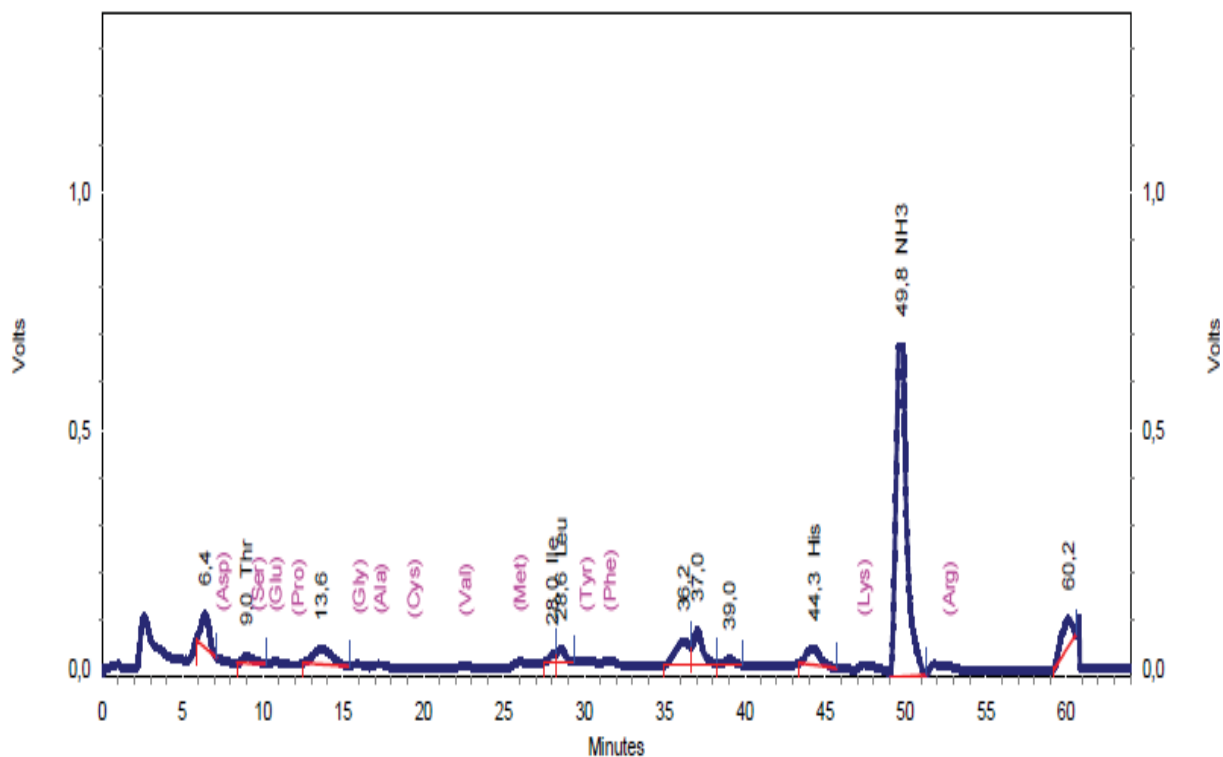
A derivatização é um procedimento químico onde os grupos carboxílicos e aminos pertencentes aos aminoácidos reagem com OPA para formar isoindoles altamente fluorescentes.⁵⁵

Em geral, juntamente com OPA são utilizadas substâncias que possuem em sua estrutura o componente sulfidril como, por exemplo, o 2-ME, o 3-MPA ou sulfito de sódio, os quais favorecem a formação de adutos hidrofóbicos do OPA com aminoácidos primários.⁵⁶ Após a formação de derivados, a separação dos aminoácidos ocorre através de uma coluna de fase reversa

Resultados e Discussão

De acordo com os aminogramas, concluí-se que a amostra **SLHenz** contém aminoácidos livres, tais como o Asp, Pro, Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Lys e Arg confirmados pelos seus respectivos picos em comparação ao aminograma padrão.

Figura 19 - Aminograma obtido do soro hidrolisado enzimaticamente.

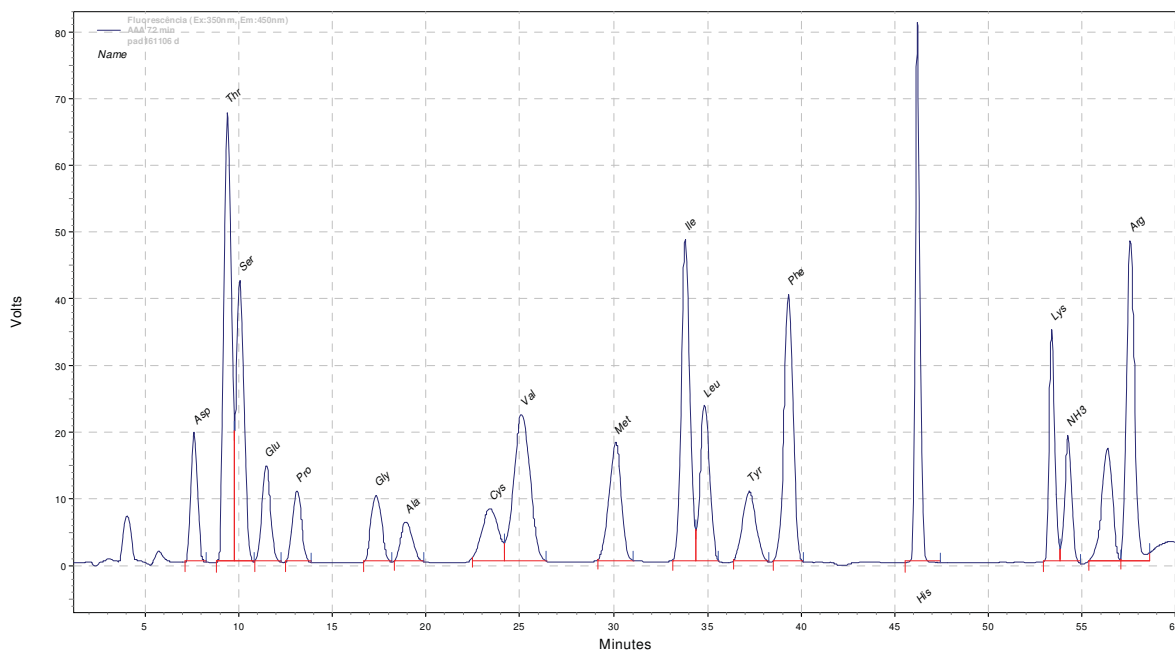


Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		6,400	2471613	0,000	0,00
2	Thr	8,975	718000	6,067	118350,78
3		13,641	2635774	0,000	0,00
4	Ile	28,000	521137	4,149	125608,50
5	Leu	28,570	876765	12,012	72988,47
6		36,195	3203363	0,000	0,00
7		37,042	3049236	0,000	0,00
8		39,034	582154	0,000	0,00
9	His	44,317	2051651	20,170	101719,08
10	NH3	49,792	32762573	0,000	76355,20
11		60,155	2847321	0,000	0,00

Totals			51719586	42,398	
--------	--	--	----------	--------	--

Figura 20 - Aminograma padrão.



Fluorescência
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,429	14704751	100,000 CAL	147047,52
2	Thr	7,678	8437882	100,000 CAL	84378,82
3	Ser	8,195	7814321	100,000 CAL	78143,20
4	Glu	8,754	5293263	100,000 CAL	52932,63
5	Pro	9,976	1124551	100,000 CAL	11245,51
6	Gly	12,805	12872902	100,000 CAL	128729,02
7	Ala	13,610	6335698	100,000 CAL	63356,98
8	Val	17,324	7993267	100,000 CAL	79932,67
9	Met	20,955	6032474	100,000 CAL	60324,73
10	Ile	26,259	8044110	100,000 CAL	80441,10
11	Leu	26,928	5243119	100,000 CAL	52431,19
12	Tyr	28,368	4920109	100,000 CAL	49201,09
13	Phe	29,532	6408116	100,000 CAL	64081,16
14	His	42,005	6966616	100,000 CAL	69666,16
15	Lys	44,983	1457863	100,000 CAL	14578,63
16	NH3	49,588	1304087	100,000 CAL	13040,87
17	Arg	50,980	10386975	100,000 CAL	103869,75

Totals

115340104

1700,000 CAL

Na realização da hidrólise das proteínas do soro do leite foram utilizadas quatro enzimas (pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase) que agiram durante um tempo de hidrólise de 120 min. Verificamos que nas condições adotadas a hidrólise das proteínas do soro do leite ocorreu pois os resultados da eletroforese SDS-PAGE e aminogramas nos indica tal fenômeno. De acordo com Biasutti⁵⁷, vários hidrolisados enzimáticos do soro do leite podem ser preparados com baixo custo e com alto teor de oligopeptídeos empregando-se a pancreatina e alguns parâmetros hidrolíticos como o tempo de reação 5, 10 e 15h. Vários autores têm demonstrado que formulações contendo elevado teor de oligopeptídeos, especialmente de di e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando, assim, maior valor nutritivo.⁵⁸

Outra ideia seria utilizarmos as enzimas alcalase juntamente com a flavourzima⁵⁹, ou até mesmo, utilizar a pancreatina com o intuito de melhorarmos o grau de hidrólise. A alcalase é uma endoprotease que quando utilizada em associação com a flavourzima que é uma exo/endoprotease aumenta em muito o grau de hidrólise. Estas duas enzimas são proteases microbianas empregadas pelas indústrias alimentícia para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais das preparações proteicas.⁶⁰

6.5 Espectroscopia vibracional na região no infravermelho

Para descrever o hidrolisado proteico e posteriormente suas correlações com as propriedades funcionais, não é necessário elucidar sua composição exata, já que se trata de uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos.

De qualquer modo, a espectroscopia vibracional no infravermelho⁶¹ tem sido aplicada para o estudo desse tipo de sistema, uma vez que essa técnica além de fornecer informações relativas à estrutura secundária da proteína (tanto no estado sólido quanto em solução)⁶²⁻⁶⁵ permite principalmente conhecer os grupos funcionais presentes (e prováveis sítios de coordenação nos espectros no IV dos complexos formados a partir dos hidrolisados).⁶⁶⁻⁶⁸

6.5.1 Infravermelho das proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise e do soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (SLHEnz)

A Figura 21 apresenta dois espectros vibracionais no IV (cm^{-1}), onde o primeiro refere-se às proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise enzimática e o segundo, refere-se ao soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (SLHEnz) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 21.

Figura 21. Espectros vibracionais no IV do soro do leite antes (**Proteína**) e depois da hidrólise (**SLHEnz**).

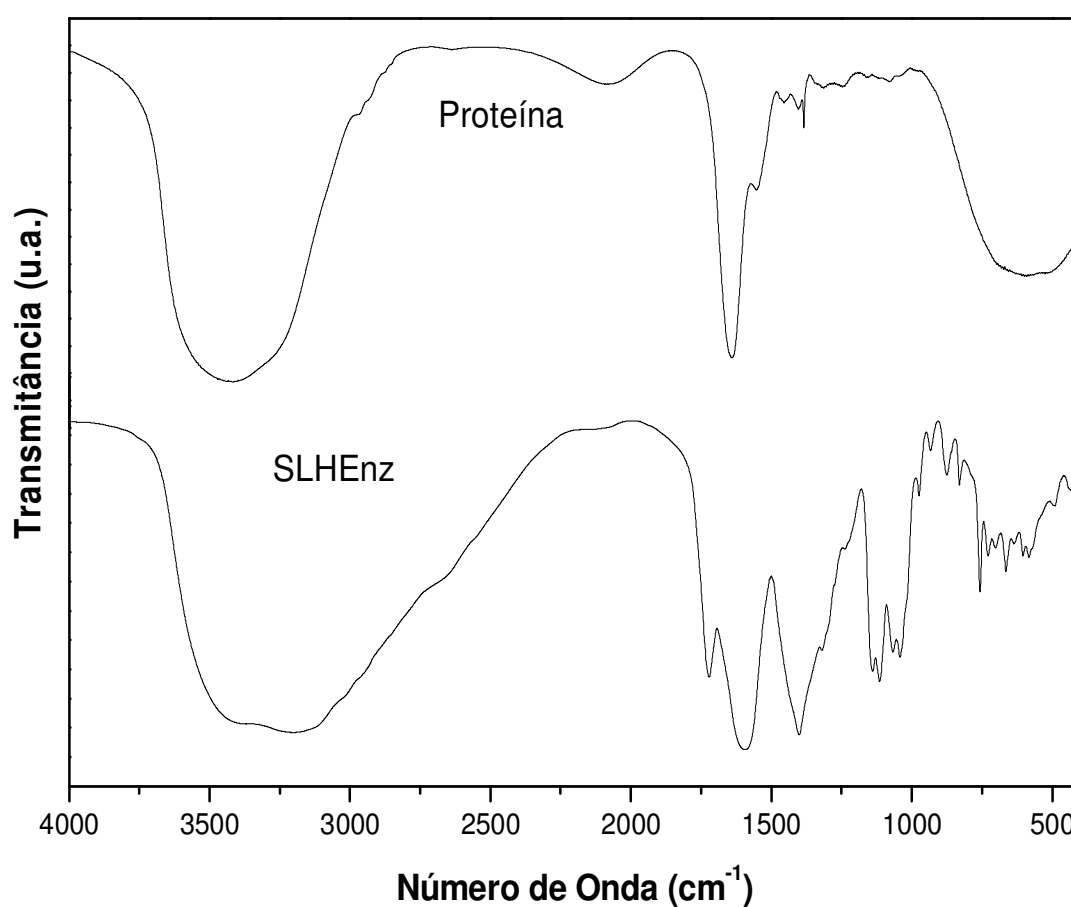
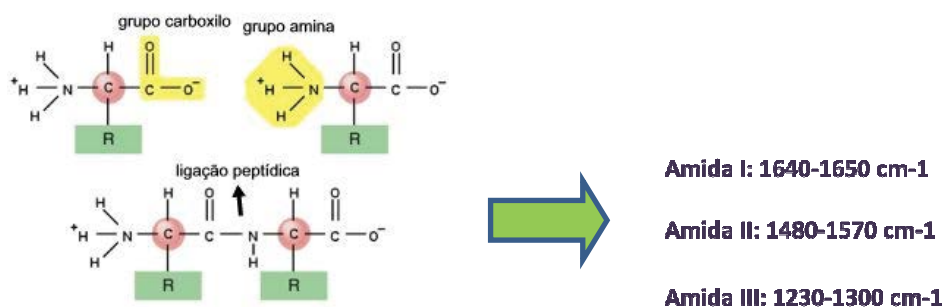


Tabela 21 - Principais frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) do soro antes (**Proteína**) e depois da hidrólise (**SLHEnz**) e suas respectivas atribuições.

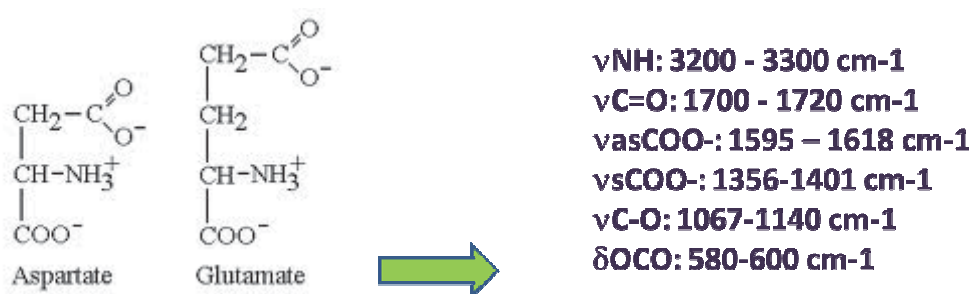
Proteína	SLHEnz	Atribuição
3423 <i>F, l</i>	3360 <i>F, l</i>	νOH
3261 <i>om</i>	3202 <i>F, l</i>	νNH
2969 <i>om</i>	2950 <i>om</i>	νCH
-	1721 <i>m</i>	$\nu\text{C=O}$
1638 <i>F</i>	-	Amida I
1551 <i>f</i>	1594 <i>F, l</i>	Amida II+ $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1404 <i>f</i>	1401 <i>F, l</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1317 <i>f</i>	1320 <i>om</i>	νCC
1116 <i>f</i>	1140 <i>m</i> + 1115 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1077 <i>f</i>	1067 <i>m</i> + 1042 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
1034 <i>f</i>	974 <i>mf</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
-	875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	$\delta\text{C-H}$
-	757 <i>f</i>	νCC
-	728 <i>f</i>	ρCH_2
-	665 <i>f</i>	ρOH
592 <i>F, l</i>	605 <i>f</i> - 583 <i>f</i>	δCOO^-
498 <i>F, l</i>	490 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
-	427 <i>f</i>	δCCC

No espectro vibracional do soro *in natura* (**Proteína**) observa-se a presença das duas principais bandas referentes à presença de ligações amida: amida I (1638 cm^{-1}) e amida II (1551 cm^{-1}). A região do espectro compreendida entre 1800 e 800 cm^{-1} é muito importante para a análise de materiais proteicos, uma vez que é neste intervalo que se observam as absorções do grupo amida (CONH)⁶¹ presente nas ligações peptídicas das proteínas e as amida I e amida II são os dois modos de vibrações mais importantes do grupo amida. A absorção referente ao modo vibracional amida I é observada, em geral, no intervalo de 1655 - 1644 cm^{-1} que apresenta contribuição principalmente do modo de estiramento da ligação C=O ,

enquanto que o modo de vibração amida II é esperado no intervalo de 1591-1530 cm^{-1} associado aos movimentos de deformação N-H e estiramento C-N. É sabido que as frequências exatas em que estas ligações amidas absorvem dependerão da estrutura secundária das proteínas ou peptídeos.⁶¹ A observação destas bandas no espectro no IV do soro *in natura* confirma, então, a presença de polipeptídeos (proteínas) no soro do leite. O esquema a seguir resume essas considerações.



Por outro lado, a análise do espectro vibracional do hidrolisado do soro nesta mesma região possibilitou a identificação das bandas em 1721, 1594, 1401 e 1140-1067 cm^{-1} associadas, respectivamente, aos modos vibracionais $\nu\text{C}=\text{O}$, $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ e $\nu\text{C}-\text{O}$ (ver esquema a seguir).



A modificação observada no espectro do soro hidrolisado (**SLHEnz**), quando comparado àquele registrado para o soro *in natura*, pode ser atribuída à presença de aminoácidos livres no hidrolisado proteico indicando que realmente a hidrólise enzimática das proteínas no soro do leite ocorreu.

Analisando as bandas no espectro vibracional do hidrolisado do soro (**SLHEnz**) em região de alta energia observa-se a presença de uma banda forte e larga na região de 3700 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} onde estão compreendidas as absorções

referentes aos movimentos vibracionais νOH (3360 cm^{-1}), νNH (3202 cm^{-1}) e o estiramento νCH em 2950 cm^{-1} pode se atribuído ao grupo $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$ que vai depender de cada aminoácido. O fato dela se apresentar alargada deve-se muito provavelmente à formação de ligações de hidrogênio do tipo $\text{O}\dots\text{H}-\text{N}$.

É importante ressaltar que a hidrólise enzimática das proteínas é dependente de umas séries de fatores, tais como fonte de proteína, tipo de enzima utilizada (por exemplo, uma enzima ácida com a pepsina ou básica como a alcalase), pH, etc. tornando assim muito difícil a identificação dos produtos finais da hidrólise.

6.5.2 Infravermelho dos Precursores

A Figura 22 apresenta os espectros vibracionais no IV dos precursores de cobalto(II) usados nesta etapa do trabalho, a saber, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ cujas frequências e atribuições estão na Tabela 22.

Figura 22 - Espectros vibracionais no IV dos precursores de cobalto.

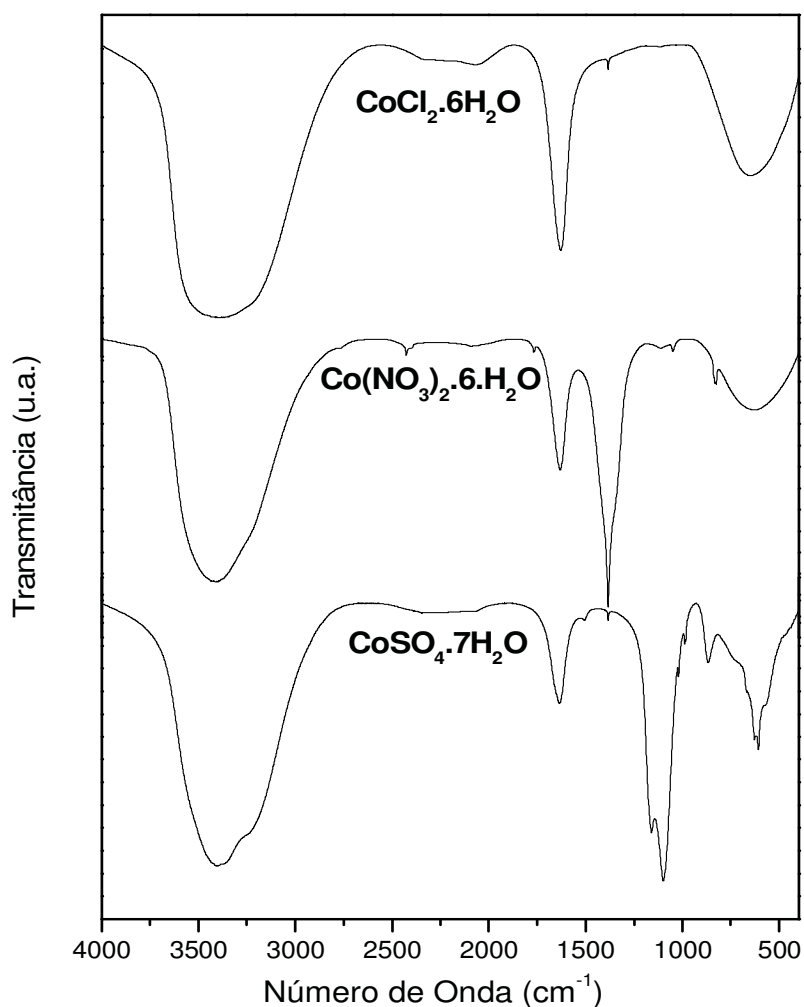


Tabela 22 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referentes aos precursores $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e suas respectivas atribuições.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Atribuição
3364 <i>F, l</i>	3418 <i>F, l</i>	3401 <i>F, l</i> – 3238 <i>om</i>	νOH
1623 <i>F, l</i>	1633 <i>F, l</i>	1633 <i>m</i>	$\delta\text{H}_2\text{O}$
-	1383 <i>F</i>	-	$\nu_{\text{as}}\text{NO}_3^-$
-	-	1157 <i>om</i> , 1100 <i>F</i>	$\nu_{\text{as}}\text{SO}_4^{2-}$
-	827 <i>f</i>	-	δNO_3^-
646 <i>m, l</i>	623 <i>m, l</i>	-	$\delta\text{H}_2\text{O}$
-	-	629 <i>m</i> - 614 <i>m</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \delta\text{SO}_4^{2-}$

O espectro vibracional no IV do precursor $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresenta uma banda forte e larga centrada em 3364 cm^{-1} atribuída ao movimento vibracional de estiramento νOH das moléculas de água, e as bandas em 1623 cm^{-1} e 646 cm^{-1} são atribuídas a movimentos de deformação angular da H_2O .

Para o precursor $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, verifica-se a presença de uma banda forte e larga em 3418 cm^{-1} atribuída ao movimento vibracional de estiramento νOH das moléculas de água, assim como as bandas em 1633 cm^{-1} e 623 cm^{-1} , atribuídas a modos de deformação. Importante destacar aqui a presença de uma banda intensa em 1383 cm^{-1} atribuída ao modo de estiramento assimétrico do íon nitrato ($\nu_{\text{as}}\text{NO}_3^-$) assim como outra banda de baixa intensidade em 827 cm^{-1} associada ao movimento de deformação do íon nitrato (δNO_3^-).^{69;70}

O precursor $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresenta uma banda forte e larga na região de 3700 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} atribuída ao movimento vibracional de estiramento νOH das moléculas de água assim como as bandas em 1633 cm^{-1} e 623 cm^{-1} , atribuídas a modos de deformação. As bandas de alta intensidade observadas em 1157 e 1100 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico S–O do íon sulfato ($\nu_{\text{as}}\text{S–O}$) enquanto que a banda em 614 cm^{-1} é atribuída ao movimento de deformação S–O do íon sulfato ($\delta\text{S–O}$).^{70;71;72}

6.5.3 Infravermelho das Amostras sintetizadas

6.5.3.1 Amostras de cobalto

6.5.3.1.1 Amostra A

A Figura 23 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **A** e do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 23.

Figura 23 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **A**.

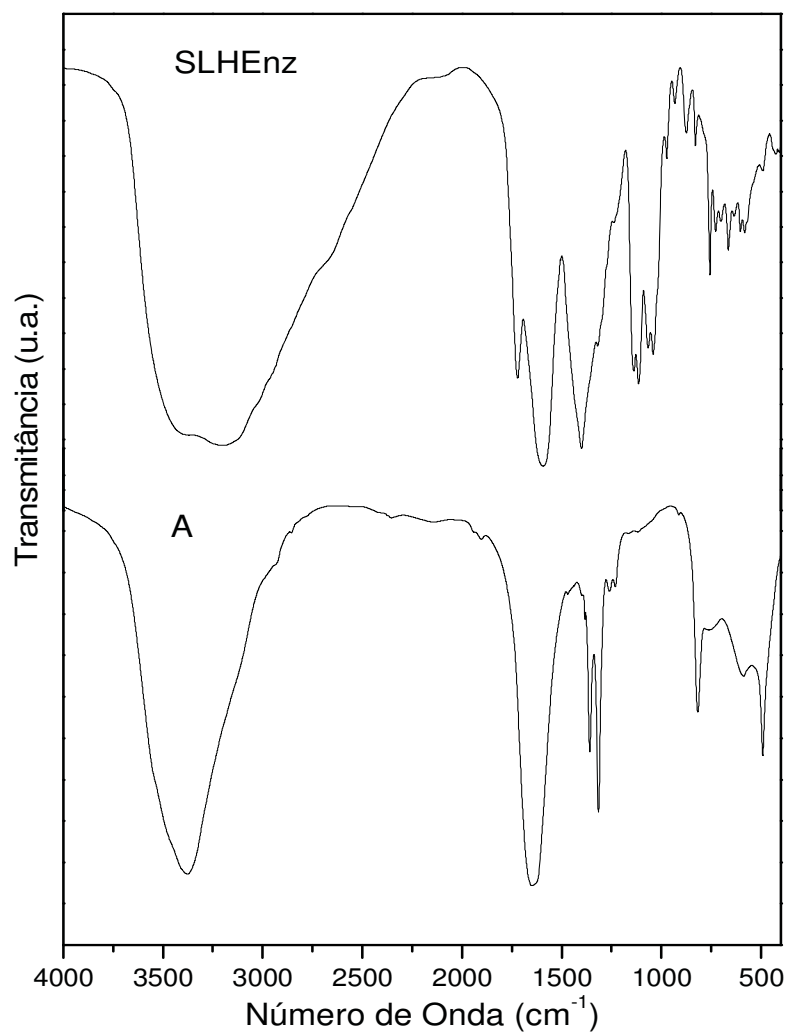


Tabela 23 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao SLHEnz e a amostra A e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	A	
3360 <i>F, l</i>	3376, <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2927 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C=O}$
1594 <i>F, l</i>	1645 <i>F, l</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1360 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1316 <i>F</i>	νCC
-	1261 <i>mf</i> - 1232 <i>mf</i>	$\delta\text{C-H}$
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	-	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	-	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	-	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	818 <i>m</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	752 <i>om</i>	νCC
728 <i>f</i>	-	ρCH_2
665 <i>f</i>	-	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	588 <i>m, l</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	492 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Comparando as frequências vibracionais no IV do amostra **A** com a do hidrolisado proteico na região $3380\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, observa-se que em **A**, além de ter havido um deslocamento da banda νNH , esta aparece consideravelmente mais fina, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio agora não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da coordenação com o cobalto. Logo, é possível inferir para essa amostra, coordenação do metal pelo sítio NH_2 .

Nesta amostra, o grupo carboxilato também é outro sítio de coordenação do hidrolisado proteico ao centro metálico. Evidências claras de coordenação são observadas no espectro de **A** pela ausência das bandas associadas aos modos de estiramento C=O (1721 cm^{-1}) e C-O ($1140\text{-}1067\text{ cm}^{-1}$), assim como pelo surgimento da banda $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ em 1645 cm^{-1} e deslocamento da $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (1401 no hidrolisado livre

para 1360 cm^{-1}). Todas essas evidências espectrais ainda permitem inferir modo de coordenação bidentado para o grupo carboxilato nessa amostra.

De acordo com a Tabela 7, para as sínteses hidrotérmicas, as alterações no pH e no solvente não influenciam na síntese da amostra **A**. Analisando as condições reacionais das sínteses convencionais compiladas pelas Tabela 5 e 6, inferimos que para as sínteses onde foram utilizadas o precursor $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, as alterações na proporção metal:ligante e troca de solvente não afetam a síntese desta amostra. Já para as sínteses onde foram utilizadas o precursor $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pode-se concluir que as alterações na proporção metal:ligante, pH e solvente são fatores que também não influenciam na síntese desta amostra.

6.5.3.1.2 Amostra B

A Figura 24 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **B** e a do hidrolisado proteico (**SLHEnz**), cujas frequências e atribuições estão na Tabela 24.

Figura 24 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **B**.

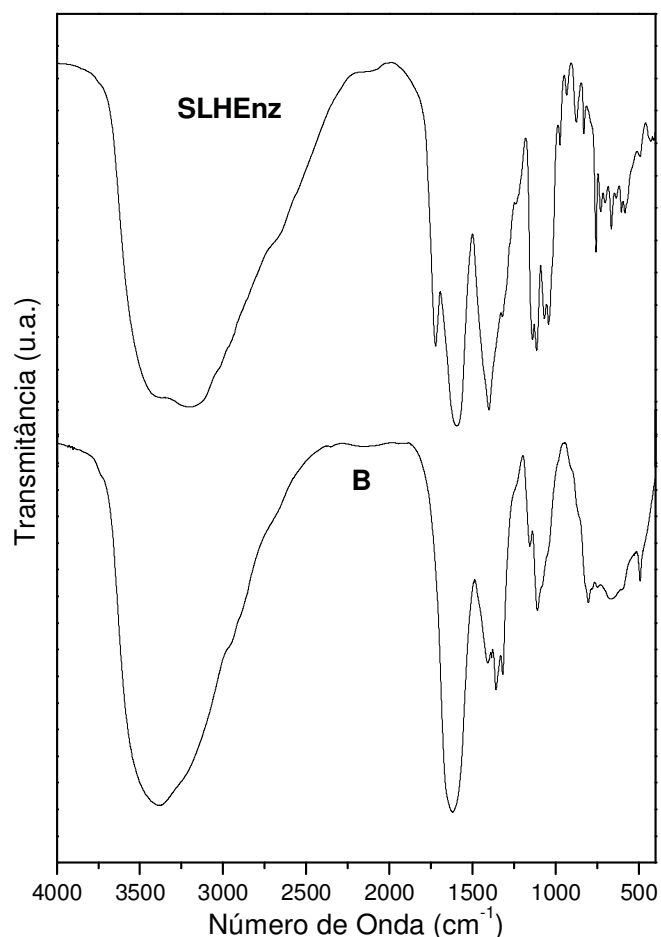


Tabela 24 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) do **SLHEnz** e amostra **B** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	B	
3360 <i>F, l</i>	3378, <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2942 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C=O}$
1594 <i>F, l</i>	1618 <i>F, l</i> -	$\delta\text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1356 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1318 <i>m</i>	νCC
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1153 <i>f</i> – 1111 <i>f</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1050 <i>f</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	-	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	873 <i>mf</i> - 804 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	766 <i>om</i>	νCC
728 <i>f</i>	-	ρCH_2
665 <i>f</i>	666 <i>f</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	600 <i>om</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	492 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) e da amostra **B**, observa-se também nesse caso uma alteração na banda próxima a 3300 cm^{-1} , podendo ser indício de que o átomo de nitrogênio do grupo amino deva estar envolvido na coordenação ao íon cobalto.

No entanto, a análise na região do grupo funcional COO^- , permite inferir que trata-se de uma amostra diferente do sólido **A**, uma vez que agora esse grupo se coordena ao metal de um modo distinto. Isso pode ser atestado pelo surgimento das bandas νCO em $1153 - 1050 \text{ cm}^{-1}$, além do deslocamento das bandas $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ (1618 cm^{-1}) e $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (1356 cm^{-1}).

De acordo com a Tabela 9, verificamos que para a síntese convencional, fixando-se o precursor $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a proporção metal:ligante, o pH e o solvente e, alterando-se apenas a temperatura, concluímos que a mudança de temperatura não influencia na síntese desta amostra.

6.5.3.1.3 Amostra C

A Figura 25 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **C** e a do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 25.

Figura 25 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **C**.

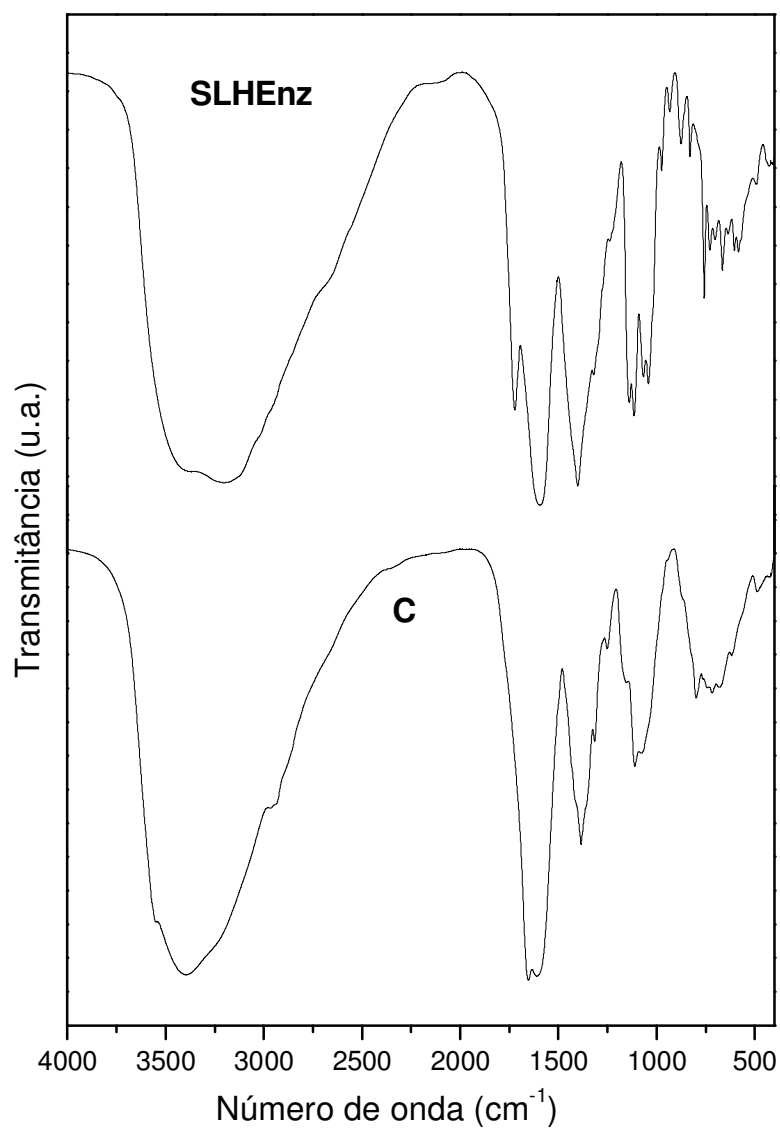


Tabela 25 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHEnz** e a amostra **C** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	C	
3360 <i>F, l</i>	3392, <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2966 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C=O}$
1594 <i>F, l</i>	1619 <i>F, l</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1384 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1315 <i>m</i>	νCC
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1154 <i>f</i> – 1111 <i>f</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1077 <i>f</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	-	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	870 <i>mf</i> - 799 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	744 <i>om</i>	νCC
728 <i>f</i>	-	ρCH_2
665 <i>f</i>	678 <i>f</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	560 <i>om</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	487 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Nesse caso, ainda que os espectros vibracionais de **B** e **C** guardem algumas semelhanças entre si, devem tratar-se de amostras diferentes, uma vez que apresentam cores distintas (rosa e roxo, respectivamente), teores de cobalto diferentes (conforme será apresentado no item 6.6) e as curvas TG/DTA também não apresentam similaridade (conforme será apresentado a seguir no item 6.7.1.2 e 6.7.1.3).

Verificamos de acordo com a Tabela 10, que para a síntese da amostra **C**, mantendo-se o mesmo precursor, proporção metal:ligante, pH e temperatura e variando apenas o solvente, concluímos que a mudança de solvente não influencia na síntese desta amostra.

6.5.3.1.4 Amostra D

A Figura 26 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **D** e a do hidrolisado protéico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 26.

Figura 26 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **D**.

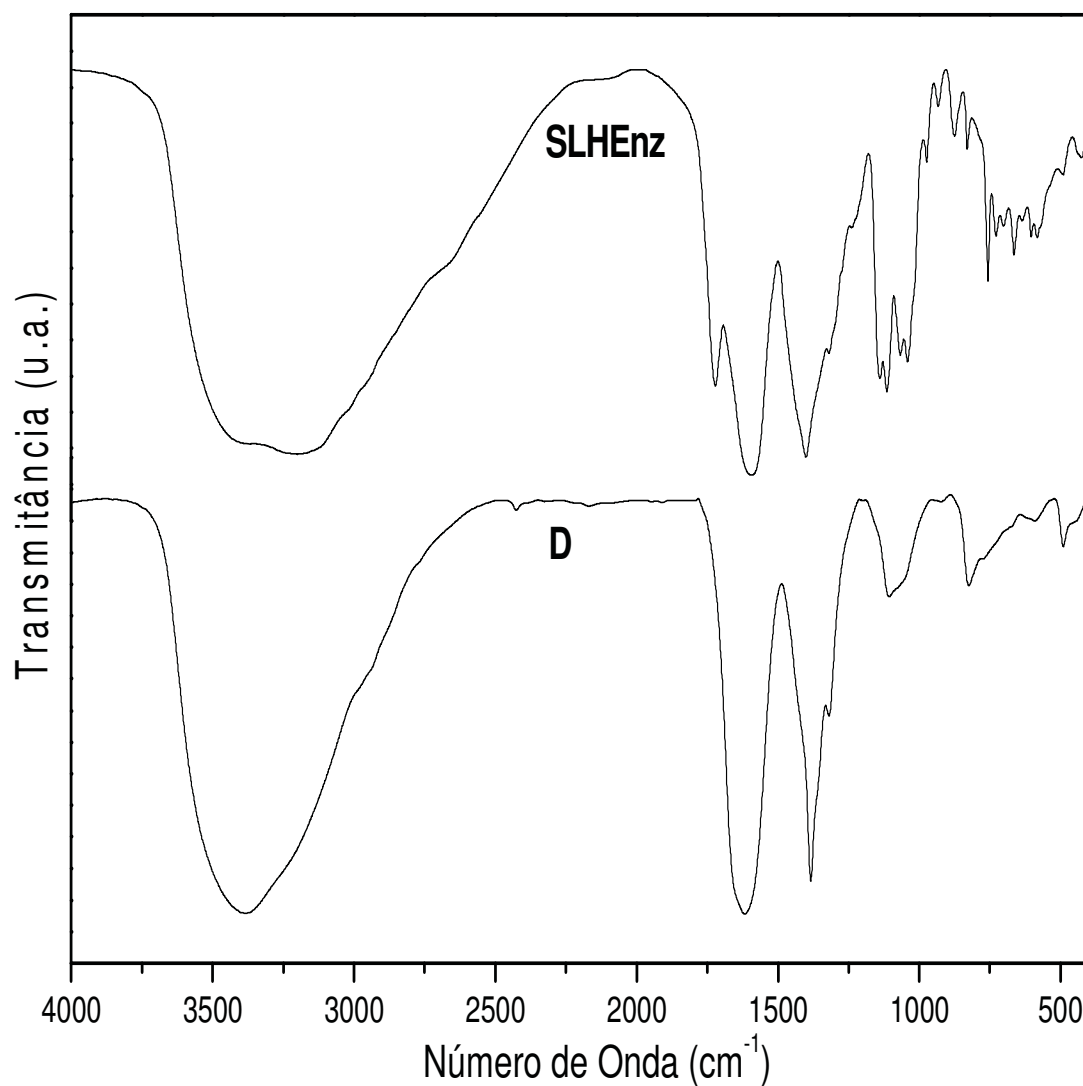


Tabela 26 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHEnz** e a amostra **D** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	D	
3360 <i>F, I</i>	3384, <i>F, I</i>	νOH
3202 <i>F, I</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2964 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C=O}$
1594 <i>F, I</i>	1616 <i>F</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, I</i>	1384 <i>F</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^- + \nu_{\text{as}}\text{NO}_3^-$
1320 <i>om</i>	1316 <i>m</i>	νCC
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1110 <i>f</i> – 1086 <i>om</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	-	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	923 <i>mf</i>	μ -peróxido
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	825 <i>f</i>	$\delta\text{C-H} + \delta\text{NO}_3^-$
757 <i>f</i>	770 <i>om</i>	νCC
728 <i>f</i>	-	ρCH_2
665 <i>f</i>	666 <i>om</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	593 <i>mf</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	489 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

A amostra **D** de cor marrom é constituído por Co (III) conforme os dados apresentados pelos autores Neville²⁷ e Jezowska.¹⁰ Trabalhos vêm demonstrando que o íon Co(III) apresenta a possibilidade de formação de espécies diméricas octaédricas, interconectadas por pontes do tipo μ -peroxo, formadas a partir da interação do nitrato de cobalto(II) com ligantes nitrogenados na presença de oxigênio, fatos estes devem estar acontecendo também na amostra **D**.

O IV foi uma técnica muito importante para diagnosticar a presença dessas pontes, uma vez que no espectro da amostra **D** pode ser observada como uma banda em 923 cm^{-1} , na mesma região que a reportada por outros trabalhos da literatura.⁷³

A coordenação do hidrolisado proteico também ocorreu nessa amostra via grupo funcional carboxilato, já que não foi observada a banda referente ao modo

$\nu_{\text{C=O}}$ (1721 cm^{-1}), além das bandas associadas aos movimentos ν_{asCOO^-} e ν_{CO} terem sido deslocadas quando comparadas com aquelas presentes no espectro do hidrolisado livre. Foi observada, ainda, a presença do grupo nitrato na amostra, cujas frequências são praticamente as mesmas que aquelas observadas no espectro vibracional do material de partida (1383 e 827 cm^{-1} , ver Tabela 22) permitindo inferir que esse grupo na amostra **D** deve estar atuando apenas como um contra-íon. Cabe destacar ainda que, a banda associada a um dos movimentos do grupo nitrato ($\nu_{\text{asNO}_3^-}$) ocorre na mesma região que aquela referente ao modo ν_{sCOO^-} do grupo carboxilato (1382 e 1376 cm^{-1} , respectivamente), o que dificultou a identificação desse modo nessa amostra. De qualquer modo, a observação da banda atribuída ao modo de deformação angular do carboxilato (δCOO^-) e a diversos modos da cadeia orgânica (ver Tabela 26) permitem concluir que ambos os grupos NH_2 e COO^- são pontos de coordenação do hidrolisado proteico ao íon cobalto.

6.5.3.1.5 Amostra E

A Figura 27 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **E** e do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 27.

Figura 27 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **E**.

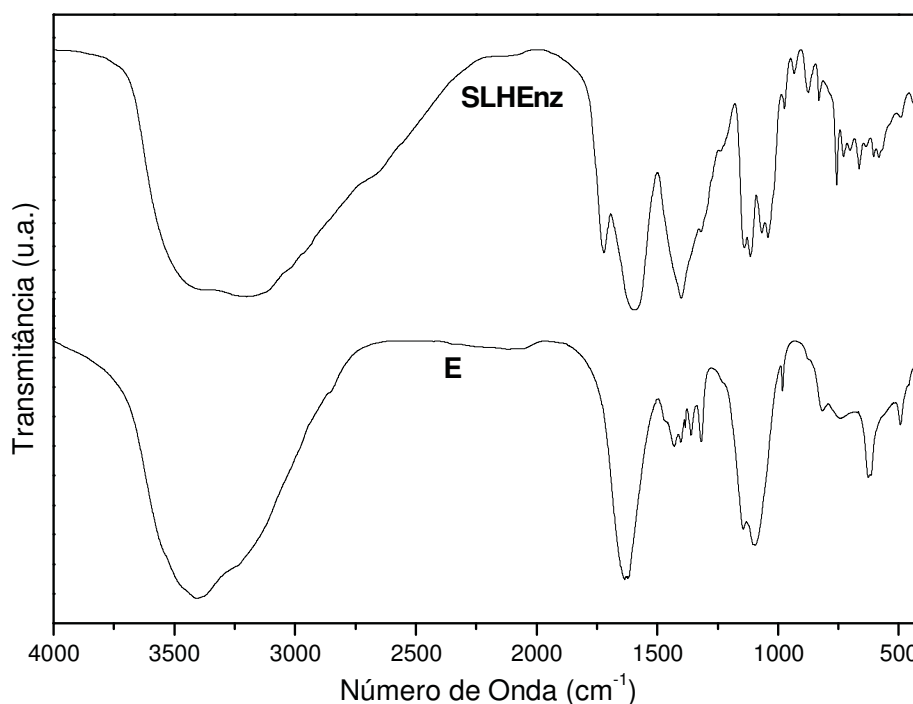


Tabela 27 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHEnz** e a amostra **E** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	E	
3360 <i>F, l</i>	3407 <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	3234 <i>om</i>	νNH
2950 <i>om</i>	2857 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C}=\text{O}$
1594 <i>F, l</i>	1625 <i>F, l</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1429 <i>f</i> - 1405 <i>f</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1315 <i>f</i>	νCC
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1145 <i>om</i> , 1103 <i>F</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{SO}_4^{2-}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1096 <i>F, l</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	983 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}^-$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	881 <i>om</i> - 817 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	744 <i>om</i>	νCC
728 <i>f</i>	-	ρCH_2
665 <i>f</i>	626 <i>om</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	613 <i>m</i> - 570 <i>om</i>	$\delta\text{COO}^- + \delta\text{SO}_4^{2-}$
490 <i>f</i>	459 <i>om</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) e da amostra **E**, verificamos a presença do íon sulfato na sua composição, uma vez que foram observadas as bandas referentes ao modo vibracional de estiramento desse ânion (1103 cm^{-1}) bem como a de deformação em 613 cm^{-1} , cujas frequências são praticamente as mesmas que aquelas observadas no espectro vibracional do material de partida (1100 e 614 cm^{-1} , ver Tabela 22) permitindo inferir que o sulfato na amostra **E** deve estar atuando apenas como um contra-íon.

Comparando as frequências vibracionais no IV da amostra **E** com a do hidrolisado proteico, observamos uma banda na região de 3800 a 2800 cm^{-1} onde é possível atribuímos os movimentos vibracionais de estiramentos νOH , νNH e νCH que quando comparadas, observamos que na amostra **E**, esta banda encontra-se mais fina e deslocada em comparação ao hidrolisado proteico, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da

coordenação com o íon cobalto, permitindo assim, inferir coordenação do sítio NH_2 ao metal.

As bandas do grupo carboxilato associada ao movimento vibracional de estiramento assimétrico ($\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$) e simétrico ($\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$) junto com o movimento vibracional de deformação do grupo carboxilato (δCOO^-) bem como a ausência da banda atribuída ao modo de estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ (1721 cm^{-1}) evidenciam que o átomo de oxigênio do grupo carboxilato (COO^-) é outro sítio provável de coordenação do hidrolisado proteico ao centro metálico. Foi observado, ainda, que o movimento vibracional de deformação de estiramento simétrico se desdobrou em dois picos sendo estes em 1429 e 1405 cm^{-1} respectivamente. De qualquer modo, a observação da banda atribuída ao modo de deformação angular do carboxilato (δCOO^-) bem com os modos da cadeia orgânica (ver Tabela 27) permitem concluir que os grupos NH_2 , COO^- são pontos de coordenação do hidrolisado proteico ao íon cobalto.

6.5.3.2 Amostras de Zinco

Tanto as amostras de zinco quanto as amostras de cobalto foram sintetizados a partir do mesmo hidrolisado proteico (**SLHEnz**).

6.5.3.2.1 Amostra F

A Figura 28 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **F** e a do hidrolisado protéico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 28.

Figura 28 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **F**.

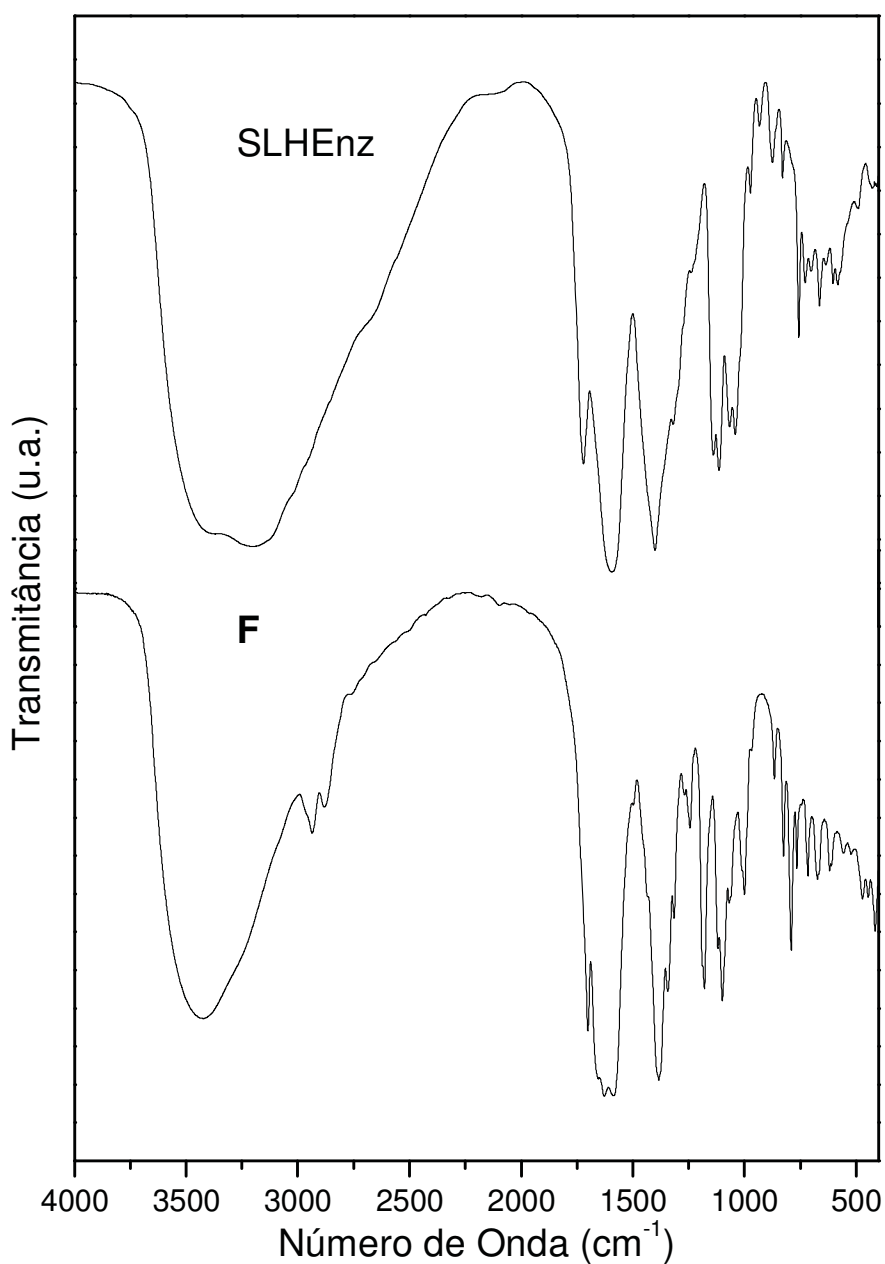


Tabela 28 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHEnz** e a amostra **F** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	F	
3360 <i>F, l</i>	3427 <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2936 <i>m</i> - 2882 <i>m</i>	νCH
1721 <i>m</i>	1701 <i>F</i>	$\nu\text{C=O}$
-	1654 <i>F, l</i> - 1628 <i>F, l</i>	Amida I
1594 <i>F, l</i>	1587 <i>F</i>	Amida II + $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1384 <i>F, l</i> - 1344 <i>F</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1316 <i>m</i>	νCC
-	1244 <i>m</i>	Amida III
1140 <i>m</i> - 1115 <i>m</i>	1180 <i>F, l</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1099 <i>F, l</i> - 1069 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	969 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}^-$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	825 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	791 <i>F</i> - 767 <i>m</i>	νCC
728 <i>f</i>	717 <i>m</i>	ρCH_2
665 <i>f</i>	674 <i>m</i> - 667 <i>m</i>	ρOH
605 <i>f</i> - 583 <i>f</i>	544 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	446 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	417 <i>m</i>	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV da amostra **F** com a do hidrolisado proteico, observamos uma banda na região de 3600 a 3000 cm^{-1} onde é possível atribuímos os movimentos vibracionais de estiramentos νOH , νNH e νCH que quando comparadas, observamos que na amostra **F**, esta banda encontra-se mais fina e deslocada em comparação a do hidrolisado proteico, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da coordenação com o íon zinco, permitindo assim, inferir coordenação do sítio NH_2 ao metal.

O hidrolisado proteico também se coordena ao íon zinco via átomo de oxigênio do grupo carboxilato, pois se observam as bandas associada aos

estiramentos $\nu_{\text{C=O}}$ em 1700 cm^{-1} e $\nu_{\text{C-O}}$ em 1100 cm^{-1} revelando que parte da amostra formada, o hidrolisado proteico está coordenado de modo monodentado. Por outro lado, o pH em que a síntese foi realizada, faz com que parte do aminoácido fique desprotonado, como no caso do glutamato, que pode estar se coordenando também por esta região, verificados pelas bandas em 1654, 1587 e 1384 cm^{-1} .

As bandas atribuídas às ligações amidas aparecem na amostra F, especialmente a banda em 1244 cm^{-1} conhecidas como amida III, trata-se de vibrações do esqueleto proteico, (principalmente envolvendo ligações C-C e C-N) que, da mesma forma que as bandas amida I e amida II, são sensíveis à conformação da molécula, neste caso, β -folha + random coil.⁷⁴

Duas amostras cristalinas adivindas das rotas de síntese **HT-ZN-N₁** e **Zn-C₅** foram obtidas após dias de repouso do sobrenadante sobre a bancada, cuja cristalinidade foi confirmada pela técnica de difratometria de raios-X. O próximo passo foi encaminhá-las para análise cristalográfica em São Carlos com o Prof. Javier A. Ellena, cujos resultados ainda não foram divulgados por ele.

Concluimos que para a rota de síntese convencional, as alterações nos precursores e proporção metal: ligante são fatores que não influenciam na síntese da amostra **F** e, para a rota de síntese hidrotérmica, a alteração do solvente não influencia na síntese desta amostra.

6.5.3.2.2 Amostra G

A Figura 29 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **G** e a do hidrolisado proteico (**SLHenz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 29.

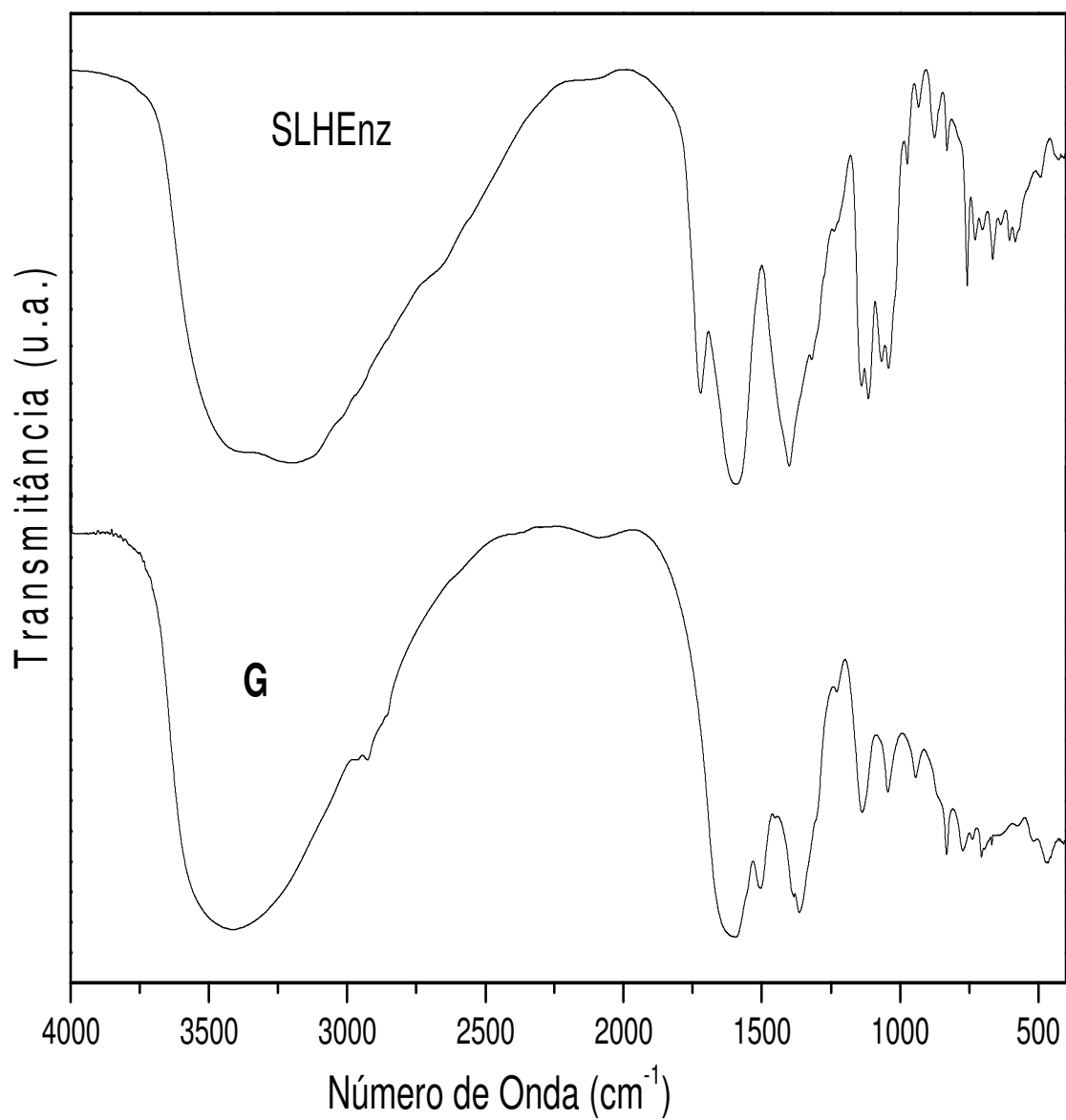
Figura 29 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **G**.

Tabela 29 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHenz** e a amostra **G** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHenz	G	
3360 <i>F, l</i>	3410 <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2964 <i>m</i> – 2927 <i>m</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C}=\text{O}$
1594 <i>F, l</i>	1596 <i>F</i> – 1506 <i>F</i>	Amida II + $\delta\text{H}_2\text{O} + \nu + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1384 <i>F, l</i>	$\nu_s\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1365 <i>F</i>	νCC
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1137 <i>F</i>	$\nu\text{C}-\text{O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1044 <i>m</i>	$\nu\text{C}-\text{O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C}-\text{H}$
974 <i>mf</i>	943 <i>m</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}^-$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	831 <i>m</i>	$\delta\text{C}-\text{H}$
757 <i>f</i>	773 <i>m</i>	νCC
728 <i>f</i>	705 <i>m</i>	ρCH_2
665 <i>f</i>	694 <i>m</i> – 668 <i>m</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	514 <i>m</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	469 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV do **SLHenz** e a da amostra **G**, inferimos que o hidrolisado proteico deva estar coordenado ao zinco através do átomo de oxigênio do grupo carboxilato (COO^-) de modo bidentado (ponte ou quelante), pois não foi observada a banda associada ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1721 cm^{-1} que comprovaria coordenação monodentada e, a ausência da banda associada ao modo de estiramento assimétrico do grupo carboxilato ($\nu_s\text{COO}^-$) colabora para tal proposição, e a Amida II é confirmada nesta amostra pela presença da banda em 1596 cm^{-1} .

6.5.3.2.3 Amostra H

A Figura 30 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **H** e a do hidrolisado proteico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 30.

Figura 30 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra **H**.

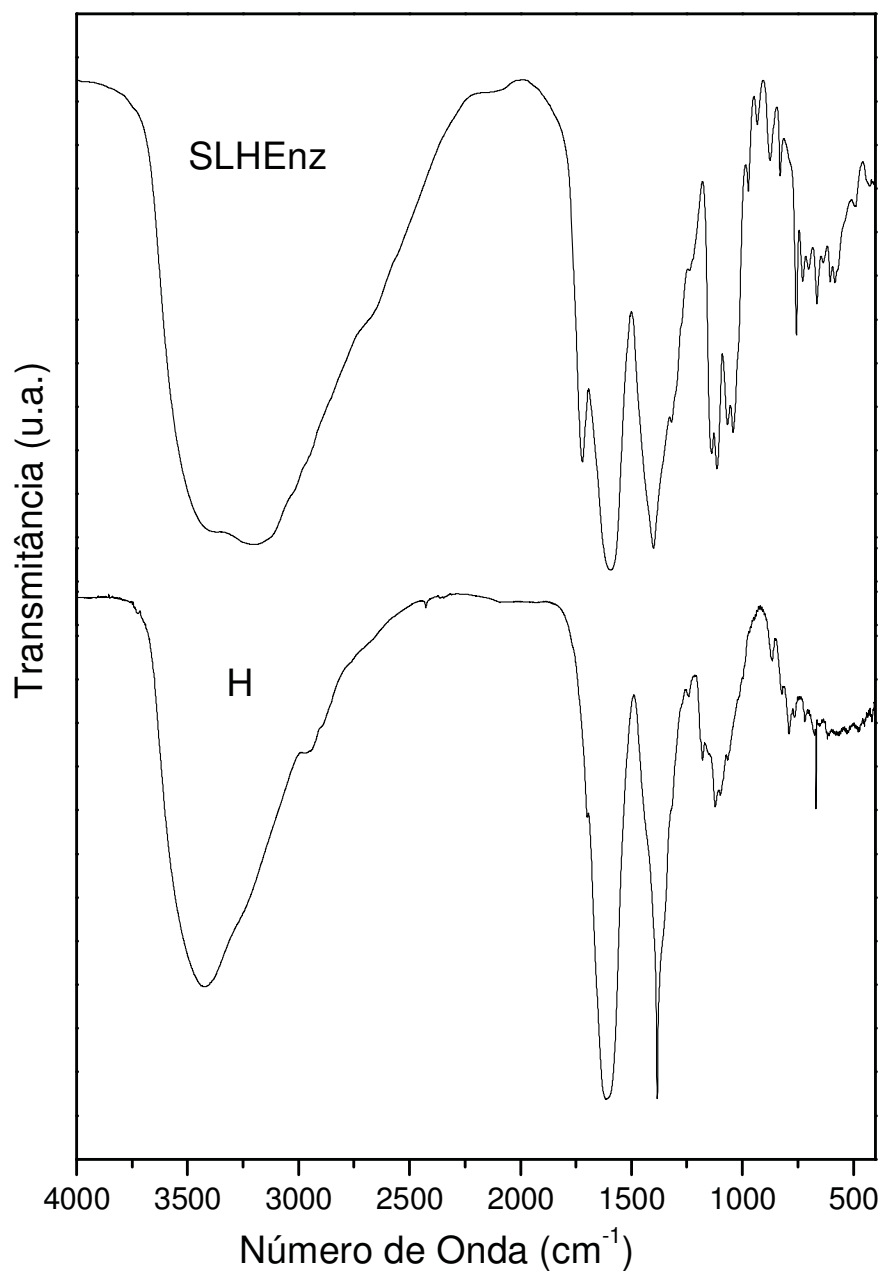


Tabela 30 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHenz** e a amostra **H** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHenz	H	
3360 <i>F, l</i>	3430 <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2945 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	-	$\nu\text{C}=\text{O}$
-	1617 <i>F</i>	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1594 <i>F, l</i>	-	$\delta\text{H}_2\text{O} + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, l</i>	1384 <i>F</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^- + \nu_{\text{as}}\text{NO}_3^-$
1320 <i>om</i>	1316 <i>m</i>	νCC
-	1244 <i>m</i>	Amida III
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1152 <i>f</i> – 1122 <i>m</i>	$\nu\text{C}-\text{O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1044 <i>m</i> – 1065 <i>m</i>	$\nu\text{C}-\text{O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C}-\text{H}$
974 <i>mf</i>	-	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}^-$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	821 <i>f</i>	$\delta\text{C}-\text{H} + \delta\text{NO}_3^-$
757 <i>f</i>	790 <i>m</i>	νCC
728 <i>f</i>	705 <i>m</i>	ρCH_2
665 <i>f</i>	687 <i>m</i> – 674 <i>m</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	579 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	478 <i>m</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	-	δCCC

Comparando as frequências vibracionais no IV da amostra **H** com a do hidrolisado proteico, observamos a banda na região de 3600 a 3000 cm^{-1} onde é possível atribuímos os movimentos vibracionais de estiramentos νOH , νNH e νCH encontra-se mais fina e deslocada na amostra H em comparação a do hidrolisado protéico, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da coordenação com o íon zinco, permitindo assim, inferir coordenação do sítio NH_2 ao metal.

O hidrolisado proteico deva estar coordenado ao zinco através do átomo de oxigênio do grupo carboxilato (COO^-) de modo bidentado (ponte ou quelante), pois não foi observada a banda associada ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1721 cm^{-1} que

comprovaria coordenação monodentada, e a banda em 1244 cm^{-1} referente à amida III aparece semelhante a amostra **F**.

A amostra **H** apresenta nitrato na sua composição, uma vez que foram observadas em seu espectro as bandas referentes aos modos vibracionais desse ânion (825 e 1384 cm^{-1}). Pelo fato delas se encontrarem praticamente na mesma região que as observadas para esse grupo em compostos iônicos, sugere-se que o grupo NO_3^- nessa amostra deve estar atuando como contra-íon.

6.5.3.2.4 Amostra I

A Figura 31 apresenta os espectros vibracionais no IV da amostra **I** e a do hidrolisado protéico (**SLHEnz**) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 31.

Figura 31 - Espectros vibracionais no IV do **SLHEnz** e da amostra I.

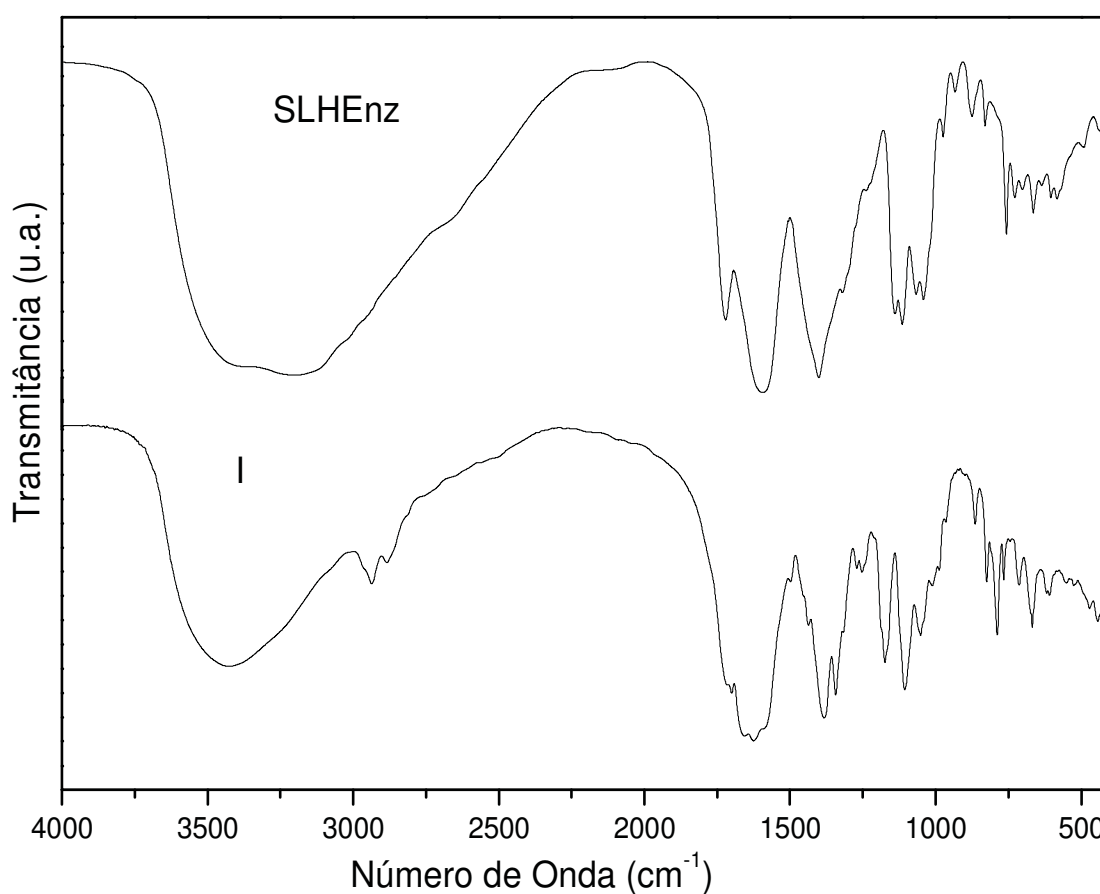


Tabela 31 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referente ao **SLHEnz** e a amostra **I** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	I	
3360 <i>F, I</i>	3431 <i>F, I</i>	νOH
3202 <i>F, I</i>	-	νNH
2950 <i>om</i>	2936 <i>m</i> – 2884 <i>m</i>	νCH
1721 <i>m</i>	1701 <i>f</i>	$\nu\text{C=O}$
-	1654 <i>F, I</i> – 1625 <i>F, I</i>	Amida I + $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1594 <i>F, I</i>	1592 <i>F</i>	Amida II + $\delta\text{H}_2\text{O}$ + $\delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 <i>F, I</i>	1384 <i>F</i> – 1343 <i>F</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1317 <i>m</i>	νCC
-	1270 <i>m</i> – 1254 <i>m</i>	Amida III
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1174 <i>F, I</i> - 1106 <i>F, I</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1052 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$ + νCN + $\delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	987 <i>f</i>	νCC + νCN
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	864 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	788 <i>F</i> – 766 <i>m</i>	νCC
728 <i>f</i>	713 <i>m</i>	ρCH_2
665 <i>f</i>	668 <i>m</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	592 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	431 <i>m</i>	αOH + αCH_2
427 <i>f</i>	417 <i>m</i>	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV da amostra **I** com a do hidrolisado proteico, verificamos que parte do hidrolisado proteico deva estar coordenado ao zinco através do átomo de oxigênio do grupo carboxilato (COO^-) de modo monodentado, pois se observam as bandas associadas ao estiramento $\nu\text{C=O}$ e $\nu\text{C-O}$ em 1701 cm^{-1} e 1106 cm^{-1} respectivamente. Por outro lado, o pH em que a síntese foi realizada, faz com que parte do hidrolisado proteico fique desprotonado, como no caso do aminoácido glutamato, que pode estar se coordenando também por esta região, verificados pelas bandas em 1654, 1592 e 1384 cm^{-1} respectivamente. As bandas relativas às três amidas aparecem na amostra **I** em 1625, 1592 e 1254 cm^{-1} indicando a preferência do zinco de se coordenar ao hidrolisado proteico diferentemente do cobalto.

6.5.3.2.5 Amostra J

A Figura 32 apresenta os espectros vibracionais do IV das amostras **J** e **SLHenz** cujas frequências e atribuições estão na Tabela 32.

Figura 32 - Espectros vibracionais no IV do **SLHenz** e da amostra **J**.

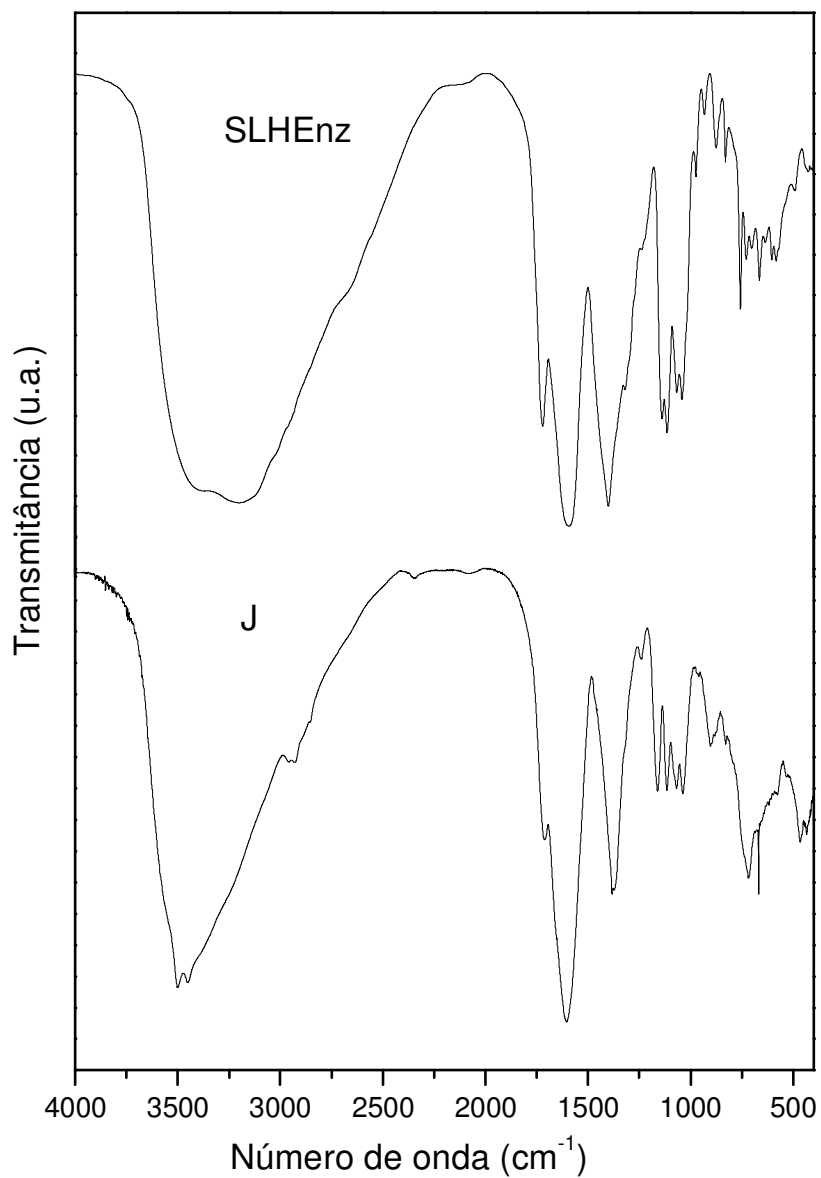


Tabela 32 - Frequências vibracionais no IV (cm^{-1}) referentes ao **SLHEnz** e a amostra **J** e suas respectivas atribuições.

Amostras		Atribuição
SLHEnz	J	
3360 <i>F, l</i>	3499 <i>F, l</i>	νOH
3202 <i>F, l</i>	3449 <i>F, l</i>	νNH
2950 <i>om</i>	2945 <i>om</i>	νCH
1721 <i>m</i>	1710 <i>f</i>	$\nu\text{C=O}$
1594 <i>F, l</i>	1604 <i>F, l</i>	$\delta\text{H}_2\text{O} + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2 + \nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1401 <i>F, l</i>	1384 <i>F</i> – 1374 <i>F</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 <i>om</i>	1317 <i>m</i>	νCC
-	1238 <i>f</i>	Amida III
1140 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	1160 <i>m</i> – 1115 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1067 <i>m</i> - 1042 <i>m</i>	1068 <i>m</i> – 1037 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 <i>mf</i>	904 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 <i>mf</i> - 830 <i>mf</i>	864 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
757 <i>f</i>	788 <i>F</i> – 766 <i>m</i>	νCC
728 <i>f</i>	720 <i>m</i>	ρCH_2
665 <i>f</i>	674 <i>m</i> – 667 <i>m</i>	ρOH
605 <i>f</i> – 583 <i>f</i>	520 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	446 <i>m</i>	$\alpha\text{OH} + \alpha\text{CH}_2$
427 <i>f</i>	434 <i>m</i>	δCCC

Analisando as frequências vibracionais no IV do SLHEnz e a amostra **J**, observamos que a banda na região de 3800 a 2800 cm^{-1} encontra-se desdobrada em dois picos e encontra-se mais fina e deslocada na amostra **J** em comparação a do hidrolisado proteico, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da coordenação com o íon zinco, permitindo assim, inferir a coordenação do sítio NH_2 ao metal.

O átomo de oxigênio do grupo carboxilato (COO^-) é outro sítio provável de coordenação dos aminoácidos ao centro metálico observados pela banda de estiramento assimétrico (ν_{as}) em 1604 cm^{-1} e a outra, referente ao modo vibracional estiramento simétrico (ν_{s}) desdobradas em 1384 e 1374 cm^{-1} .

A banda atribuída a ligação amida aparece na amostra **J** em 1238 cm^{-1} conhecida como amida III, que trata-se de vibrações do esqueleto proteico, (principalmente envolvendo ligações C-C e C-N).

Acrescenta-se ainda, que o deslocamento observado para a banda de deformação do carboxilato em relação ao hidrolisado livre (583 cm^{-1}) bem como as alterações substanciais na energia e intensidade da banda νNH , νCC e νCN permite concluir que ambos os grupos NH_2 e COO^- são pontos de coordenação ao zinco nestas amostras.

Concluimos que a alteração na proporção metal: ligante para a rota de síntese convencional não influencia na síntese desta amostra.

6.6 Complexometria com EDTA, Análise Elementar e Intervalo de Decomposição

O hidrolisado do soro do leite é uma mistura de diversos aminoácidos e pequenos peptídeos com alta capacidade de coordenação ao centro metálico, e por essa razão, torna-se impossível identificar a presença de aminoácidos ou peptídeos específicos. Contudo, para descrever o hidrolisado e seus complexos aqui obtidos, bem como estudar suas propriedades funcionais, não é necessário elucidar a composição exata dessas espécies. Por essa razão, os dados analíticos obtidos, que estão apresentados na Tabela 33, devem ser analisados com o devido cuidado, imaginando tratar-se de uma “composição média” do material formado.

Tabela 33 - Cores, dados analíticos e intervalos de decomposição das amostras sintetizadas.

Amostra	Cor	Complexometria		Análise Elementar			dec.(°C)
		Co(II) %	Zn(II) %	C%	H%	N%	
A	Rosa Claro	25,57		13,46	3,15	2,28	194 - 198
B	Rosa Escuro	20,48		15,86	3,71	0,53	192 - 196
C	Roxo	22,44		*	*	*	186 - 190
D	Marrom	25,22		17,44	3,38	3,41	182 - 188
E	Rosa Salmão	23,34		11,63	4,06	3,31	196 - 200
F	Amarelo Mostarda		18,08	23,01	3,76	4,78	175 - 179
G	Marrom		19,30	12,03	3,53	0,83	185 - 190
H	Amarelo Mostarda		17,33	20,53	3,63	1,84	181 - 186
I	Amarelo Mostarda		17,70	26,23	4,17	3,44	101 - 195
J	Amarelo Mostarda		19,85	19,37	4,01	1,64	183 - 189

*aguardando resultados

É sabido que o metal quando complexado com aminoácidos, dipeptídeos ou tripeptídeos apresenta alta estabilidade e, tende a ser absorvido no intestino de forma semelhante a um dipeptídeo ou tripeptídeo que normalmente apresentam altos coeficientes de absorção, conferindo assim um aumento da absorção pelo organismo, tornando-o mais biodisponível e menos tóxico.

Por essa razão, utilizando os minerais quelatados na suplementação animal, estes substituem as fontes minerais inorgânicas em níveis mais baixos, mantendo ou até mesmo aumentando a sua absorção.

As amostras sintetizadas neste trabalho, que envolvem a coordenação dos íons Co(II) e Zn(II) com os aminoácidos ou dipeptídeos presentes no hidrolisado proteico do soro do leite, apresentam teores de metal na faixa de aproximadamente 17 a 25%.

A DEG é uma das maiores importadoras de insumos farmacêuticos e cosméticos do Brasil. Sua linha de produtos já ultrapassa a casa dos 1000. Dentro de sua linha de produtos para suplementação alimentar, existe o quelato de zinco, que é um produto comercializado na forma quelatada com aminoácidos. Outra empresa de destaque na suplementação humana, veterinária e agrícola é a Orgolabs Orgânicos LTDA da cidade de Descalvado - SP, que comercializa vários quelatos, dentre estes, os quelatos de zinco a 20%. As amostras de zinco sintetizadas neste trabalho encontram-se na mesma ordem dos encontramos hoje no mercado e dentro dessa perspectiva, o próximo passo do trabalho será efetuar ensaios para avaliar a potencialidade de utilização das amostras obtidas neste trabalho como minerais quelatados para suplementação animal.

O fato das amostras sintetizadas apresentarem baixo teor de carbono pode ser atribuído ao fato de estarem com muita água na sua composição, evidenciados pelos espectros no IV e pelas curvas TG-DTA, ou até mesmo, pode estar formando uma amostra polimérica, como por exemplo, no caso da amostra **D**, que se apresenta na forma μ -peróxido em ponte.

6.7 Análise térmica (TG/DTA) das amostras de cobalto e zinco

6.7.1 Amostras de Cobalto

6.7.1.1 Amostra A

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **A** estão representadas na Figura 33, cujos resultados encontram-se na Tabela 34.

Figura 33 - Curvas TG e DTA da amostra **A**.

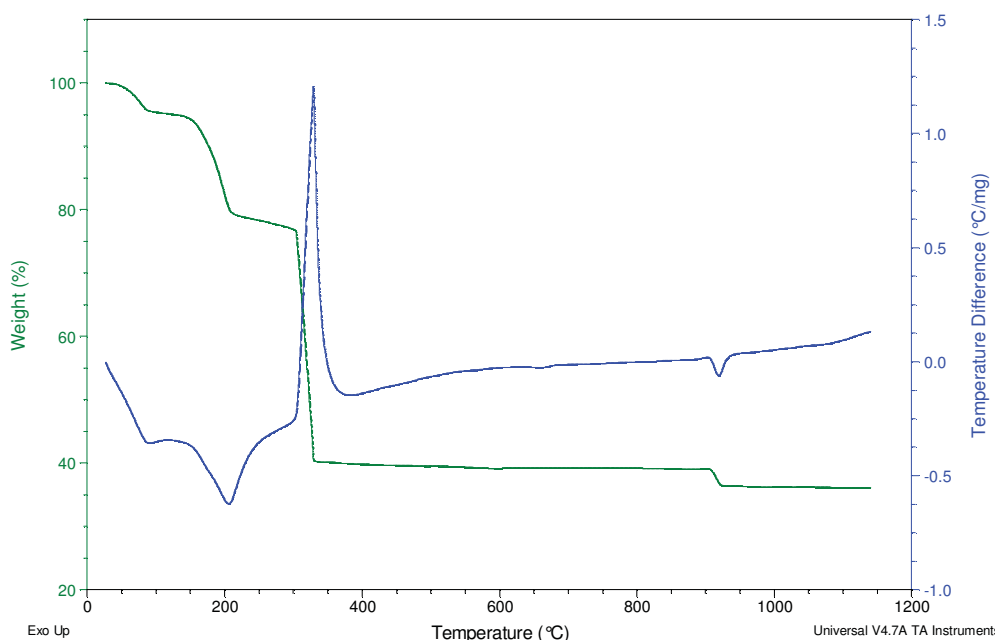


Tabela 34 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **A**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
A	8,0170	1	0 – 84,76	-4,17	85	
		2	84,76 – 209,4	-15,96	207	
		3	209,4 – 304	-3,05		
		4	304 – 331,8	-36,5		330
		5	908 – 926	-3,92	926	

A decomposição da amostra **A** ocorre em cinco etapas consecutivas. A primeira etapa caracteriza-se pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 85 °C); na segunda, terceira e quarta etapas ocorre a eliminação da água de coordenação e a decomposição térmica do hidrolisado proteico que estava coordenado, evidenciados pelos picos em 207 °C e 330 °C, respectivamente. Na

última etapa observa-se provavelmente a formação de CoO (pico endotérmico em 926 °C) que será confirmado posteriormente por DRX de pó do resíduo obtido.

6.7.1.2 Amostra B

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **B** estão representadas pela Figura 34 cujos resultados encontram-se na Tabela 35.

Figura 34 - Curvas TG e DTA da amostra **B**.

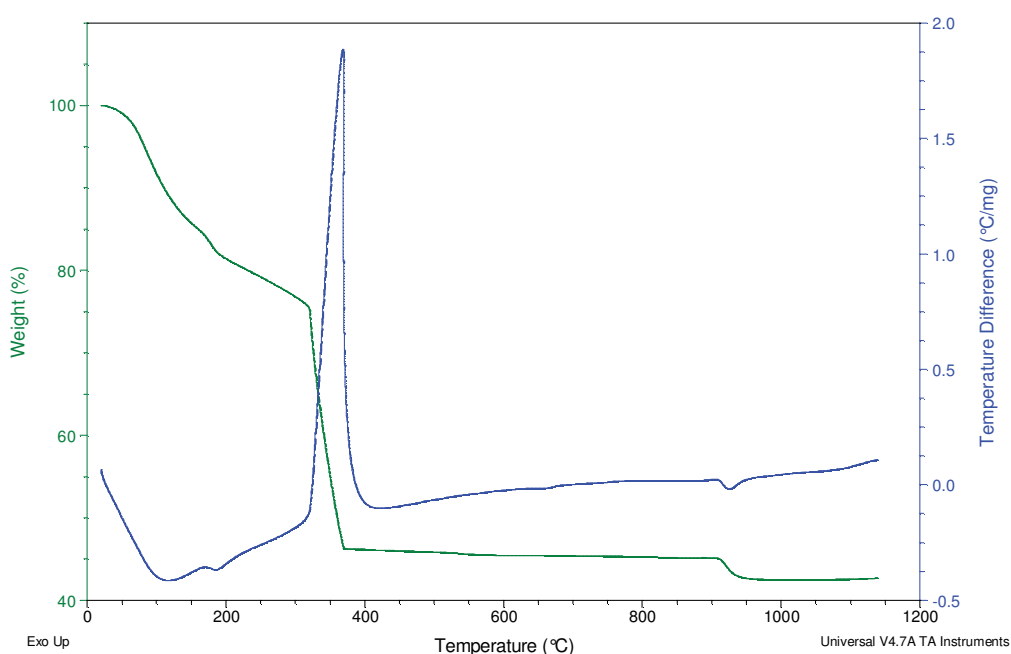


Tabela 35 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **B**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
B	10,8220	1	0 – 316	-24,23	85	
		2	316 – 371	-29,53		337
		3	209,4 – 304	-2,57	927	

A decomposição da amostra **B** ocorreu em três etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 85 °C); a segunda pela decomposição térmica do hidrolisado proteico coordenado ao íon cobalto junto com a eliminação da água de coordenação (evidenciados pelo pico exotérmico em 337 °C) e na terceira etapa houve provavelmente a formação de CoO (pico em 927 °C) que será confirmado posteriormente por DRX de pó.

6.7.1.3 Amostra C

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **C** estão representadas pela Figura 35 cujos resultados encontram-se na Tabela 36.

Figura 35 - Curvas TG e DTA da amostra **C**.

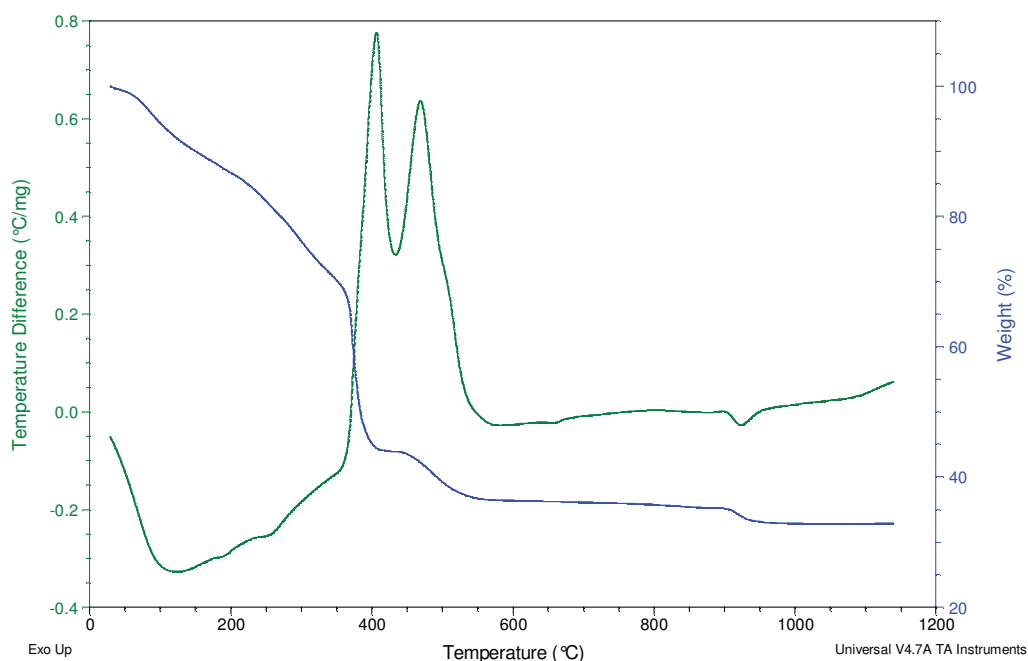


Tabela 36 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **C**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
C	13,4840	1	0 – 361	-31,52	113	
		2	361 – 419	-24,46		407
		3	419 – 567	-7,52		454
		4	907 – 955	-1,98	926	

A decomposição da amostra **C** ocorreu em quatro etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 113 °C); a segunda e a terceira, pela decomposição térmica do hidrolisado proteico juntamente com a eliminação da água de coordenação e a quarta pela provável formação de CoO que será confirmado posteriormente por difratometria de raios-X.

Importante destacar que esses resultados mostram um processo de queima totalmente diferente para esse composto, uma vez que foram observados dois picos exotérmicos (407 °C e 454 °C) revelando que o íon metálico deva estar coordenado a dois ligantes (peptídeos) diferentes nesse caso.

6.7.1.4 Amostra D

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **D** estão representadas pela Figura 36 cujos resultados encontram-se na Tabela 37.

Figura 36 - Curvas TG e DTA da amostra **D**.

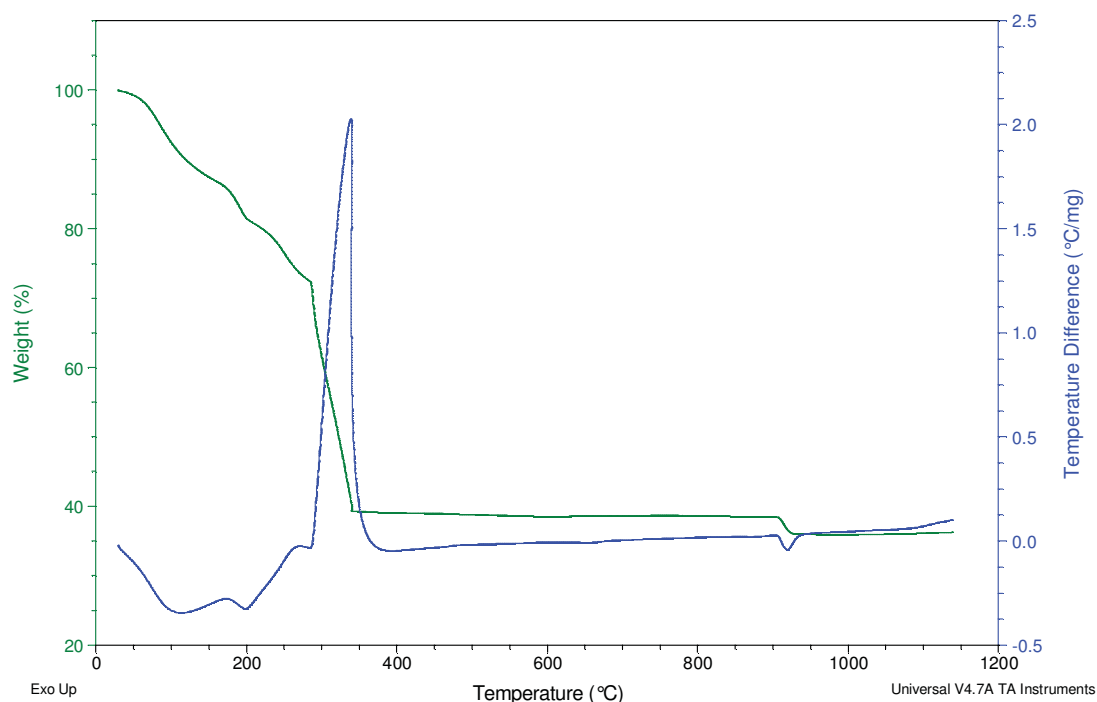


Tabela 37 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **D**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
D	10,7760	1	0 – 173	-13,9	108	
		2	173 – 286	-14,09	202	
		3	286 – 340	-32,61		330
		4	907 – 955	-2,42	926	

A decomposição da amostra **D** ocorreu em quatro etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 108 °C); a segunda caracterizada pela eliminação da água de coordenação (pico endotérmico em 202 °C) e a terceira pela decomposição térmica do material orgânico, evidenciado pelo pico exotérmico em 330 °C confirmando a coordenação do hidrolisado proteico ao íon cobalto. A quarta etapa deve estar associada à provável formação de CoO (pico endotérmico em 926 °C) que será confirmado posteriormente por DRX.

6.7.1.5 Amostra E

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **E** estão representadas pela Figura 37 cujos resultados encontram-se na Tabela 38.

Figura 37 - Curvas TG e DTA da amostra **E**.

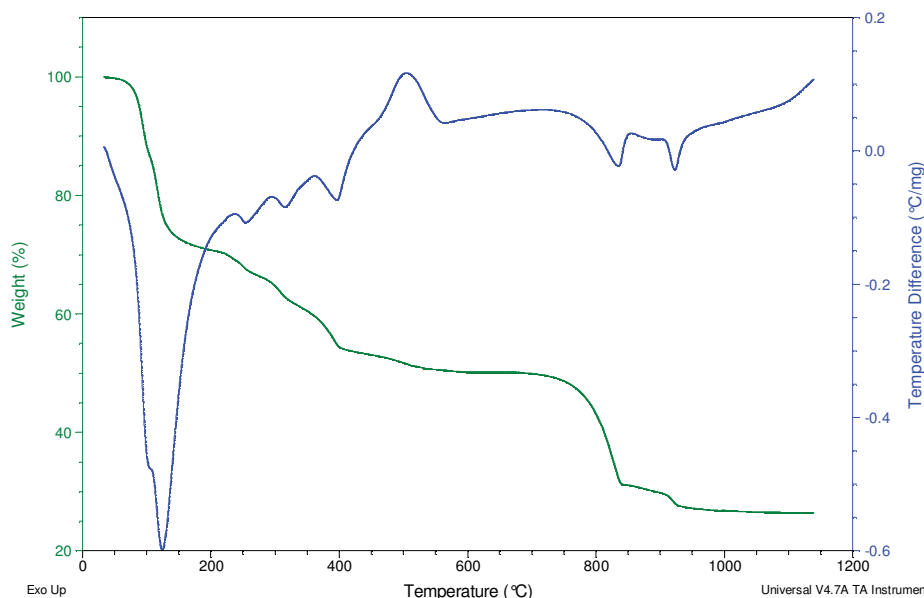


Tabela 38 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **E**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
E	6,9720	1	0 – 133	-25,9	118	
		2	133 – 399	-19,8		366
		3	399 – 840	-23,22		508
		4	840 – 913	-1,68	820	
		5	913 – 929	-1,8	926	

Verificamos pela decomposição da amostra **E** que a mesma aconteceu em cinco etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 118 °C) enquanto que as demais etapas evidenciam as eliminações das águas de coordenação e a provável formação do CoO que será confirmado posteriormente por DRX do Pó. Importante notar que no termograma da amostra **E** não se evidencia a clara eliminação do hidrolisado proteico (queima do hidrolisado) como observado nas amostras anteriores, inferindo assim, que a amostra **E** possa se tratar apenas do precursor sulfato de cobalto. Novas curvas serão refeitas nesse caso.

6.7.2 Amostras de Zinco

6.7.2.1 Amostra F

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **F** estão representadas na Figura 38, cujos resultados encontram-se na Tabela 39.

Figura 38 - Curvas TG e DTA da amostra **F**.

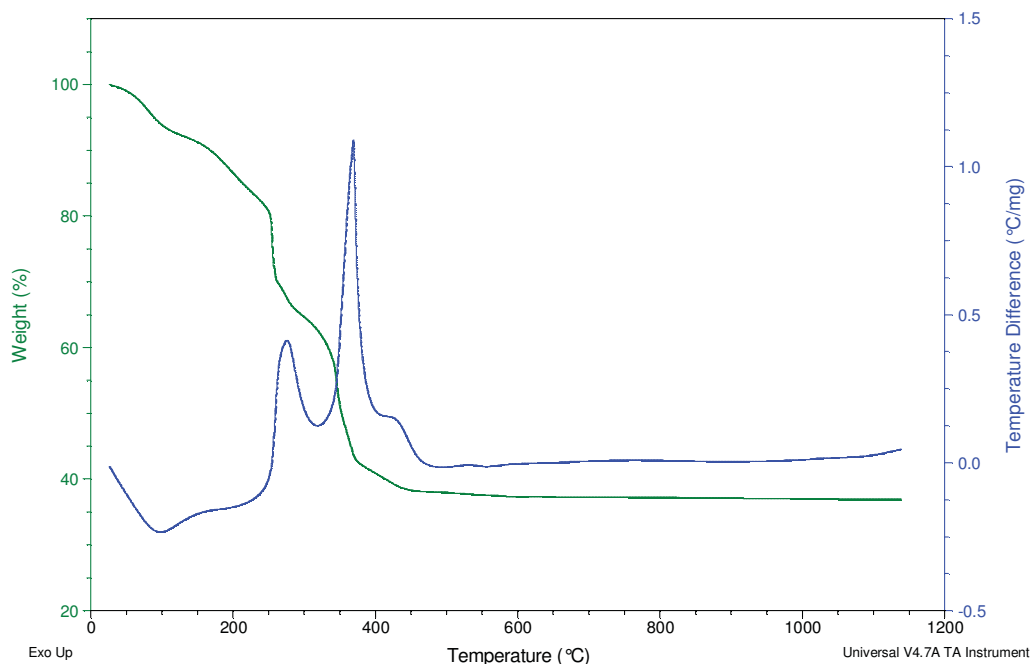


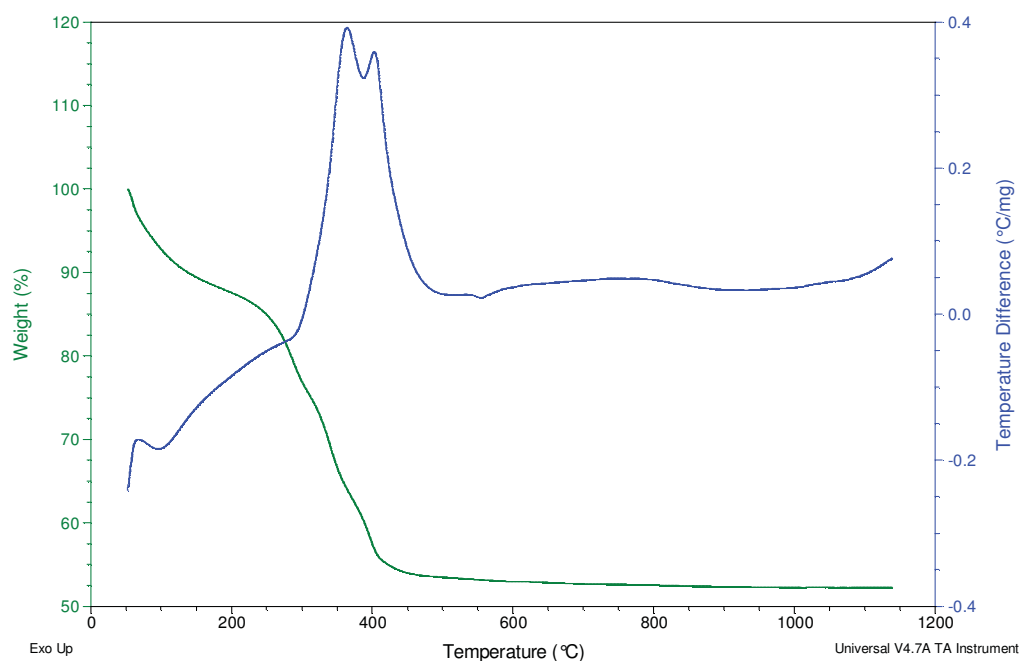
Tabela 39 - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **F**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
F	13,1250	1	0 – 250	-19,71	114	
		2	250 – 342	-22,28		323
		3	342 – 448	-19,83		385

A decomposição da amostra **F** ocorreu em três etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 114 °C). A decomposição térmica da matéria orgânica ocorre nesse caso em duas temperaturas diferentes (323 °C e 385 °C), evidenciando que o íon Zn(II) nessa amostra deva estar coordenado a dois ligantes diferentes.

6.7.2.2 Amostra G

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **G** estão representadas na Figura 39, cujos resultados encontram-se na Tabela 40.

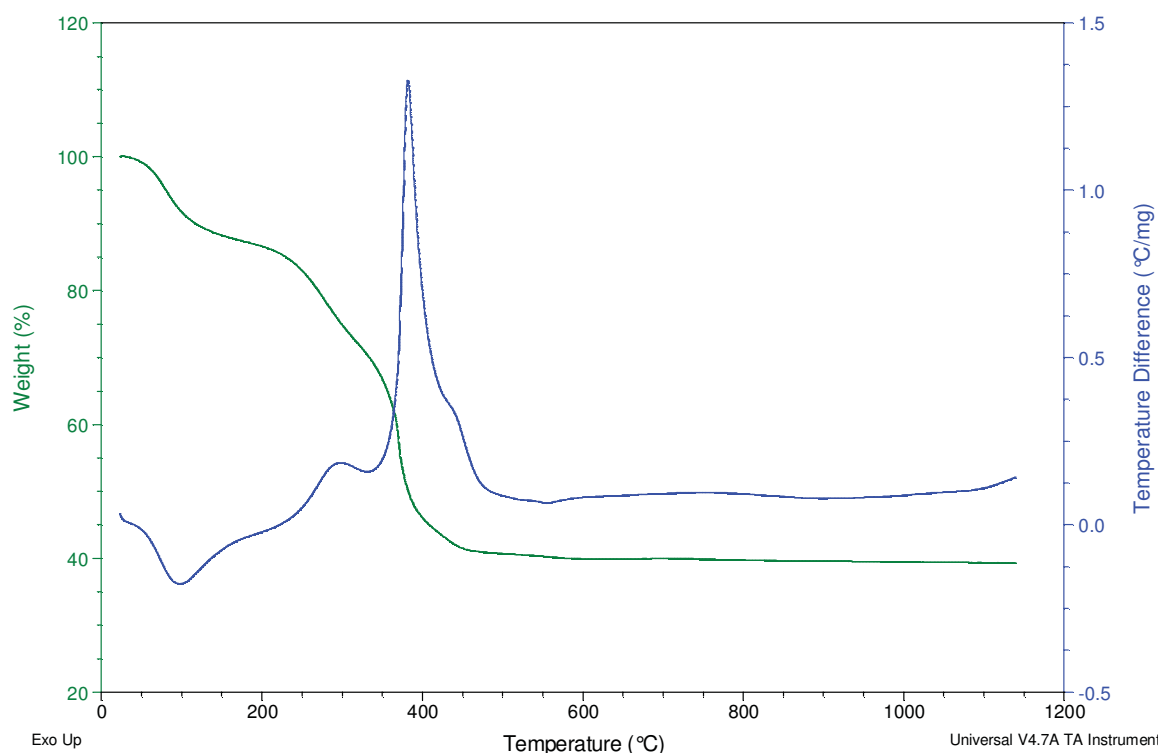
Figura 39 - Curvas TG e DTA da amostra **G**.**Tabela 40** - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **G**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
G	10,3380	1	0 – 253	-14,3	118	
		2	253 – 600	-33,7		375-400

A decomposição da amostra **G** ocorreu em duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 118 °C) e a segunda evidenciada pelos dois picos exotérmicos em 375 °C e 400°C referente à decomposição térmica do hidrolisado proteico. A amostra **G** parece conter também dois ligantes diferentes coordenados ao íon metálico zinco. No entanto, as curvas TG e DTA deverão ser refeitas nesse caso, pois durante a realização da mesma ocorreu uma queda de energia.

6.7.2.3 Amostra H

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **H** estão representadas pela Figura 40 cujos resultados encontram-se na Tabela 41.

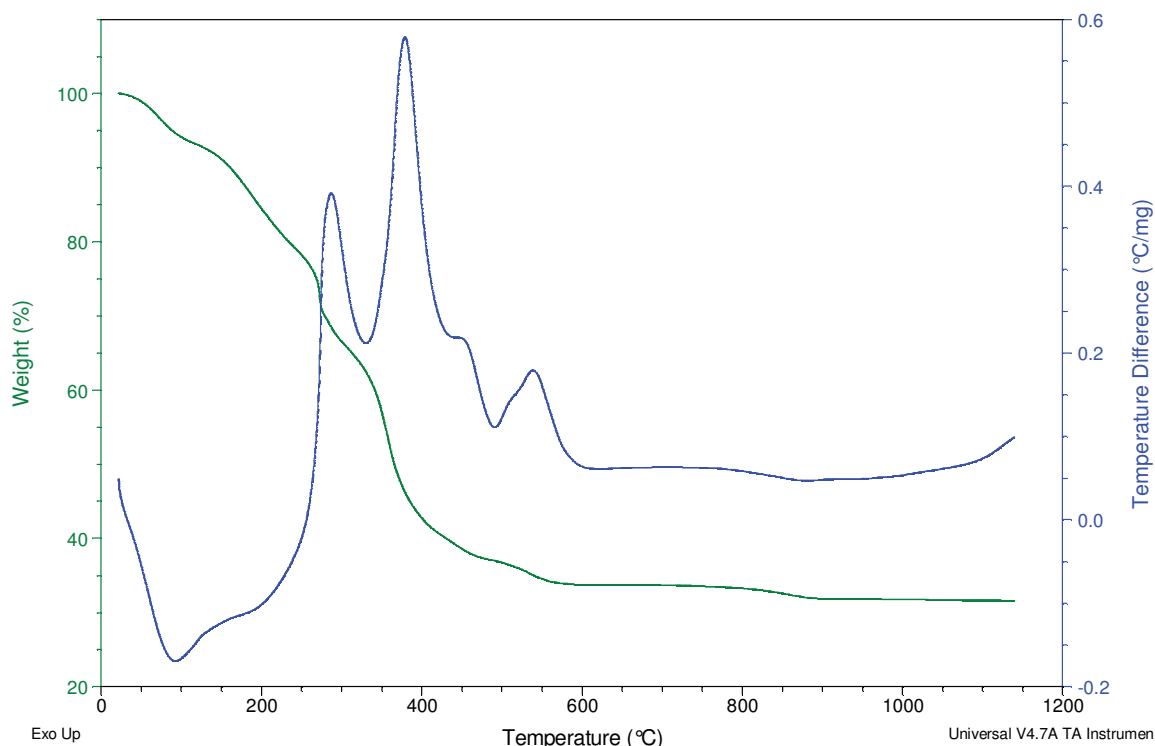
Figura 40 - Curvas TG e DTA da amostra **H**.**Tabela 41** - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **H**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
H	7,1470	1	0 – 225	-14,6	108	
		2	225 – 360	-18,83		342
		3	360 – 453	-25,27		390

A decomposição da amostra **H** ocorreu em três etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede (pico endotérmico em 108 °C). Outras duas etapas foram observadas, através dos picos exotérmicos em 342 °C e 390 °C, e estão associadas à decomposição térmica do material orgânico. Dois ligantes diferentes devem estar presentes também na esfera de coordenação dessa espécie.

6.7.2.4 Amostra I

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra **I** estão representadas pela Figura 41 cujos resultados encontram-se na Tabela 42.

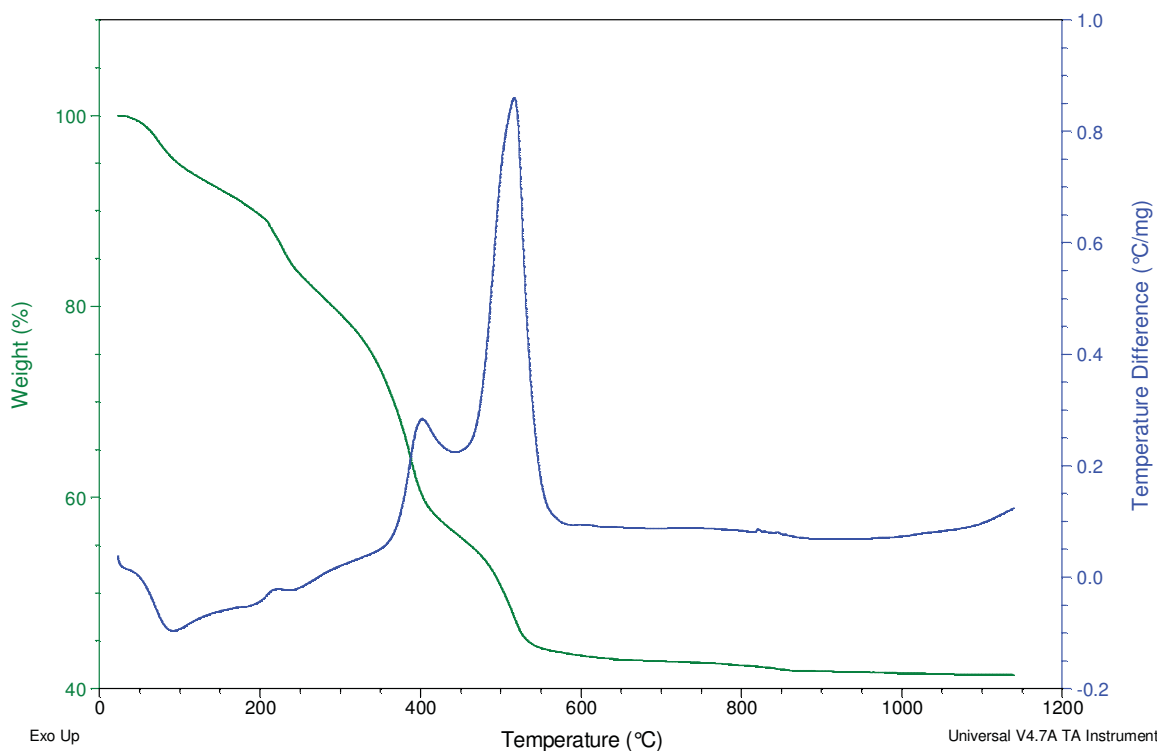
Figura 41 - Curvas TG e DTA da amostra I.**Tabela 42** - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra I.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
I	8,8470	1	0 a 150	-8,6	85	
		2	150 a 275	-10,9		294
		3	275 a 885	-38,62		390-553

A primeira etapa de decomposição térmica da amostra I pode ser observada através do pico endotérmico em 85 °C e associada à perda de moléculas de água de rede. Puderam ser observadas, em temperaturas mais altas, três etapas associadas à decomposição térmica do hidrolisado proteico (294, 390, 553 °C), que permitem inferir a existência de três espécies orgânicas diferentes coordenadas ao íon zinco.

6.7.2.5 Amostra J

As curvas termogravimétricas (TG) e de análise térmica diferencial (DTA) referentes à decomposição térmica da amostra J estão representadas pela Figura 42 cujos resultados encontram-se na Tabela 43.

Figura 42 - Curvas TG e DTA da amostra **J**.**Tabela 43** - Principais dados termoanalíticos das curvas TG e DTA da amostra **J**.

Comp.	M _{inicial} (mg)	Etapas	Intervalo de T (°C)	Δm (%)	DTA / (°C)	
					Endo	Exo
J	8,6580	1	0 a 210	-11,1	86	
		2	210 a 416	-30,6		410
		3	416 a 900	-16,6		530

A decomposição da amostra **J** ocorreu em três etapas, sendo a primeira caracterizada pela eliminação da água de rede evidenciada pelo pico endotérmico em 86 °C; a segunda e a terceira pela decomposição térmica do hidrolisado proteico, evidenciados pelos picos exotérmicos em 410 °C e 530 °C. A presença dos dois picos exotérmicos evidencia a presença de dois fragmentos orgânicos coordenados ao íon zinco.

6.8 DRX pelo método do pó para as amostras Zn-C₅ e HT-Zn-N₁

Foram obtidos os difratogramas de raios-X das amostras de Zn(II) preparadas através das rotas de síntese **Zn-C₅** e **HT-Zn-N₁**, cujos difratogramas estão representados nas Figuras 43 e 44, respectivamente.

Figura 43 - Difratograma de raios-X da amostra **Zn-C₅**.

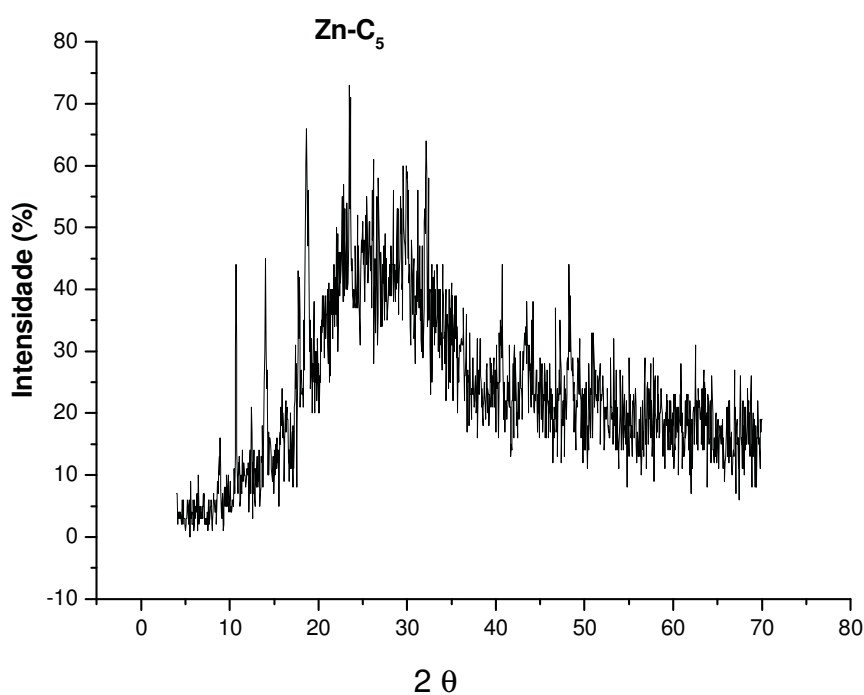
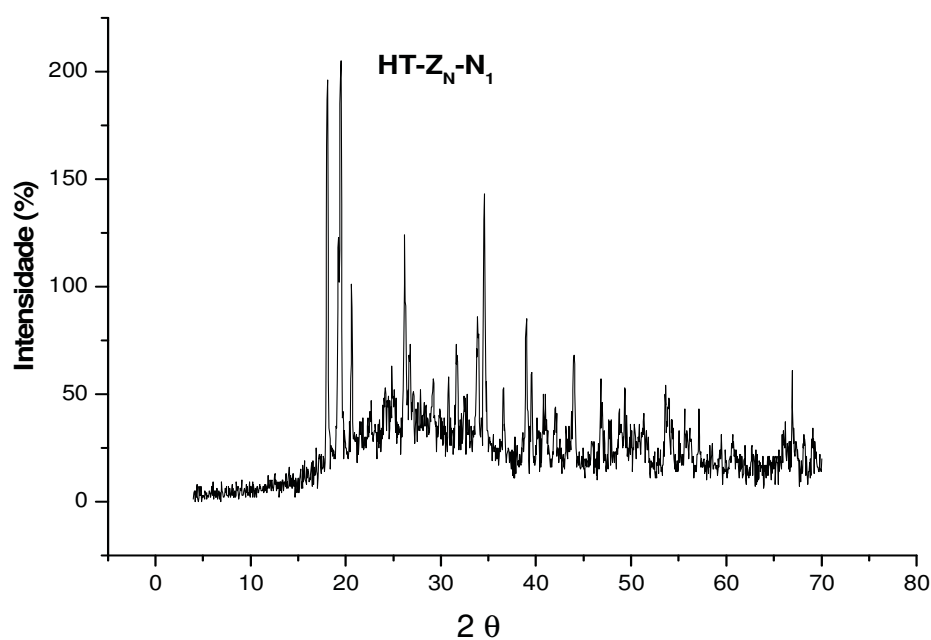


Figura 44 - Difratograma de raios-X da amostra **HT-Zn-N₁**.



Os difratogramas mostram tratar-se de espécies diferentes e que apresentam um considerável grau de cristalinidade, o que não foi observado para as espécies de cobalto. Parece que as condições reacionais favoráveis para que isso aconteça envolvem o uso de uma proporção molar de metal maior que a de ligante, bem como de uma mistura de solventes EtOH/DMF 50/50 v/v.

6.9 Ensaio Biológico

6.9.1 Determinação da Atividade Biológica frente ao *Mycobacterium tuberculosis in vitro*.

Para a determinação da atividade biológica das amostras de Co(II) e Zn(II) frente à cepa de MTB H₃₇R_V – ATCC 27294 era necessário que as amostras fossem solúveis em DMSO ou em água e, o fato foi que, todas as amostras obtidas foram praticamente insolúveis nestes solventes, impossibilitando a sua determinação.

O teste para a determinação da atividade biológica chegou a ser realizado, considerando-se que pouca quantidade da amostra estivesse se dissolvido no solvente e, para todas as amostras submetidas a esta condição, os resultados deram todos negativos.

O próximo passo será descobrir em quais solventes ou mistura de solventes estas amostras se solubilizam, para depois realizar novos testes de atividade biológica.

7 CONCLUSÕES

Podemos separar o trabalho realizado em duas fases. A primeira, referente à obtenção, hidrólise e análise do hidrolisado proteico obtido a partir do soro do leite, revelou que as condições de hidrólise usadas (enzima, tempo, pH, temperatura, relação enzima : substrato) possibilitaram a obtenção de aminoácidos livres e possivelmente pequenos peptídeos.

Na segunda fase, foram obtidos dez amostras inéditos, a partir da interação entre sais de Co(II) e Zn(II) com o hidrolisado proteico obtido a partir do soro do leite. Dois deles acreditamos terem sido obtidos na forma de monocristais, que serão analisados no IFUSP de São Carlos pelo Prof. Dr. Javier A Ellena. As condições experimentais adotadas nas duas rotas sintéticas usadas (material de partida, solvente, pH, temperatura e relação molar metal : hidrolisado) foram sistematicamente controladas para que esses resultados pudessem ser alcançados. O fato de, a partir de um mesmo hidrolisado proteico e os dois íons de metais de transição, terem sido obtidos essa gama de amostras deveu-se ao fato de estarmos utilizando um sistema polifuncional com grande capacidade de coordenação aos centros metálicos. Por este motivo, temos a convicção de que novos e importantes amostras serão obtidas de maneira a compor uma lista multimineral a ser testada em sistemas biológicos e que poderá apresentar grande viabilidade comercial num futuro próximo.

O próximo passo contemplará a realização de ensaios visando a aplicação das amostras obtidas como substâncias nutracêuticas e também, se for o caso, metalofármacos.

8 PERSPECTIVAS

À luz das considerações supracitadas, este trabalho abre uma série de perspectivas, dentre as quais podemos propor:

(A) Recorrer às seguintes técnicas para um melhor entendimento da natureza dos hidrolisados e dos complexos formados:

- Espectrometria de Massas;
- Ressonância Magnética Nuclear para as amostras de zinco;
- Susceptibilidade Magnética para as amostras de cobalto;
- Estudos de magnetismo à baixa temperatura para as amostras de cobalto;
- Dicroísmo Circular;
- TG e DTA do **SLHenz** e dos precursores metálicos;
- Espectroscopia Raman;
- Espectroscopia eletrônica no ultravioleta visível (UV/Vis);

(B) Analisar os resultados da cristalografia das duas amostras encaminhados ao Prof. Javier A. Ellena;

(C) Testar métodos de purificação dos sólidos obtidos (recristalização, uso de colunas cromatográficas, etc.);

(D) Testar novos solventes para a solubilização das amostras;

(E) Alteração das condições experimentais da hidrólise enzimática do soro do leite, por exemplo, o tempo e a utilização de outras enzimas; trabalho que já está sendo realizado no ITAL e UNICAMP, sob a coordenação das Prof^a Maria Teresa Bertoldo Pacheco e Prof^a Dr^a Flavia Maria Netto;

(F) Realização de novas sínteses pela rota convencional variando: precursores, a proporção metal:ligante; condições reacionais como abaixamento de temperatura e na ausência de NaOH;

(G) Realização de novas sínteses hidrotérmicas variando: precursores, proporção metal:ligante, tempo e temperatura na tentativa de obter-se monocristais adequados à resolução estrutural via difração de raios X;

(H) Investigar a amostra **D**, que é marrom e deve conter ligantes peróxido em ponte a dois centros de Co(III), como modelo mimético para transporte de oxigênio;

- (I) Avaliar a biodisponibilidade das amostras de Co e Zn obtidas nesse trabalho, a partir de estudos de dissolução/ permeação dos complexos obtidos em cultura de células Caco-2;
- (J) Avaliar a possibilidade de utilização das amostras obtidas como suplemento alimentar de cobalto e zinco em ração animal.

REFERÊNCIAS

- 1 MAIA, E. C. P.; DEMICHELI, C. P. Química de coordenação em sistemas biológicos. In: FARIAS, R. F. **Química de coordenação fundamentos e atualidades**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2009. Cap. 6, p. 167-204.
- 2 ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 60, p. 729-738.
- 3 McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. 6th. ed. Edinburgh: Pearson Education, 2002. 693 p.
- 4 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Principais deficiências minerais em bovinos de corte**. Campo Grande, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc112>>. Acesso em: 14 out. 2011.
- 5 MORAIS, S. C. D. D. et al. Altos níveis dietéticos de cobre no desempenho e no colesterol sérico e muscular de frangos de corte. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 1-5, 2001.
- 6 GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. D. **Introdução à bioquímica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2006. 357 p.
- 7 KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. Cobalt proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 261, n. 1, p. 1-9, 1999.
- 8 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H. **Inorganic chemistry**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. 819 p.
- 9 LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. 527 p.
- 10 JEŻOWSKA-TRZEBIATOWSKA, B. Complex compounds as models of biologically active systems. **Pure and Applied Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 367-390, 1974.
- 11 PANIZ, C. et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B₁₂ e seu diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 323-334, 2005.
- 12 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- 13 UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3rd. ed. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 614 p.

- 14 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington, DC.: National Academy Press, 2001. 381 p.
- 15 McDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. 524 p.
- 16 COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Advanced inorganic chemistry**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 1455 p.
- 17 HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.
- 18 VAHRENKAMP, H. Why does nature use zinc - a personal view. **Dalton Transactions**, n. 42, p. 4751-4759, 2007.
- 19 PEREIRA, T. C.; HESSEL, G. Deficiência de zinco em crianças e adolescentes com doenças hepáticas crônicas. **Revista Paulista Pediatria**, v. 27, n. 3, p. 322-328, 2009.
- 20 ASHMEAD, H. D.; SAMFORD, R. A. Effects of metal amino acid chelates or inorganic minerals on three successive lactations in dairy cows. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 2, n. 3, p. 181-188, 2004.
- 21 MORAES, S. S.; SILVA, G. N.; DÖBEREINER, J. Microelementos minerais e a "cara inchada" dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 25-33, 1994.
- 22 MILLS, C. F. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals - copper, cobalt and zinc. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 6, p. 1702-1711, 1987.
- 23 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Novos microelementos minerais e minerais quelatados na nutrição de bovinos**. Campo Grande, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc119/>>. Acesso em: 14 out. 2011.
- 24 NÚCLEO DE PESQUISAS APLICADAS. **A Química dos quelatos**. Jaboticabal, 2001. Disponível em: <<http://www.npa.ind.br/Aquimicadosquelatos.asp>>. Acesso em: 23 out. 2011.
- 25 STANILA, A. et al. Spectroscopic studies of some copper(II) complexes with amino acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 834, p. 364-368, 2007.
- 26 MASOUD, M. S. et al. Synthesis and characterization of some pyrimidine, purine, amino acid and mixed ligand complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 1, p. 230-238, 2008.

- 27 NEVILLE, R. G. Cysteine complexes with the cobalt(III) ion. IV. Structure and interrelationship of the bis- and tris-cysteinates of cobalt(II) and cobalt(III). **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 3, p. 518-519, 1957.
- 28 GILBERT, J. B.; OTEY, M. C.; PRICE, V. E. The enzymatic susceptibility of the red cobalt complexes of several dipeptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 377-389, 1951.
- 29 JOSHI, S. K.; HINGE, V. K.; SHRIVASTAVA, B. D. EXAFS studies of cobalt(II) complexes with amino acids. In: INTERNATIONAL CONFERENCE X-RAY ABSORPTION FINE STRUCTURE, 13th, 2007, Stanford. **Proceedings...**Melville: AIP Publishing, 2007. v. 882, p. 337-339.
- 30 RUSU, D. et al. Synthesis and characterization of some cobalt (II) complexes with amino acids having biological activities. **Revista de Chimie**, v. 60, n. 9, p. 939-943, 2009.
- 31 DAMAJ, Z. et al. Co(II)(L-proline)₂(H₂O)₂ solid complex: characterization, magnetic properties, and DFT computations. Preliminary studies of its use as oxygen scavenger in packaging films. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 12, n. 1, p. 17-20, 2009.
- 32 DAN, M.; RAO, C. N. R. Metal aminocarboxylate coordination polymers with chain and layered structures. **Chemistry European Journal**, v. 11, n. 23, p. 7102-7109, 2005.
- 33 ROMBACH, M.; GELINSKY, M.; VAHRENKAMP, H. Coordination modes of amino acids to zinc. **Inorganica Chimica Acta**, v. 334, p. 25-33, 2002.
- 34 DOLINSKA, B. The properties of solid Zn(II)-amino acid complexes in the form of suspensions. **IL Farmaco**, v. 56, n. 10, p. 737-740, 2001.
- 35 REDDY, P. R.; RADHIKA, M.; RAO, K. S. Interaction of zinc and cobalt with dipeptides and their DNA binding studies. **Journal of Chemical Sciences**, v. 116, n. 4, p. 221-226, 2004.
- 36 GELINSKY, M.; VAHRENKAMP, H. Zinc complexes of a helical 22-mer peptide with two histidine donors. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 9, p. 2458-2462, 2002.
- 37 SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.
- 38 KOSIKOWSKI, F. U. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.
- 39 HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. D.; PAULA, H. D. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

- 40 ALVES FILHO, M. A. **A nata do soro**: proteína retirada de subproduto do leite reforça defesa do organismo. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2002/unihoje_ju194pag02.html>. Acesso em: 15 out. 2011.
- 41 GIROTO, J. M.; PAWLOSWSKY, J. O soro do leite e as alternativas para seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, p. 43-44, 2001.
- 42 MARQUES, D. P. et al. Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-TRISACRYL. **Revista de Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 17-20, jan./mar. 2005.
- 43 LIRA, H. D. L. et al. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2009.
- 44 PACHECO, M. T. B. et al. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 47-55, 2006.
- 45 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 46 HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.
- 47 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- 48 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. Cap. 1, p. 207-208.
- 49 McDONALD, C. E.; CHEN, L. L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p. 175-177, 1965.
- 50 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage - T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- 51 OLIVEIRA, C. N. et al. Titulação complexométrica de zinco, cobre e cobalto. **Eclética Química**, v. 10, p. 7-10, 1985.
- 52 MARQUES, D. P. **Separação e hidrólise das proteínas do soro de leite**: alternativas para o reaproveitamento deste resíduo. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

53 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publisher, 2011. 1124 p.

54 ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

55 SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 431, p. 271-284, 1988.

56 KRASNOVA, I. N.; KARTSNOVA, L. A.; CHERKAS, Y. V. Determination of amino acids in human blood serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the isocratic elution mode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, p. 58-65, 2000.

57 BIASUTTI, E. A. R. et al. Action of pancreatin for obtaining whey protein hydrolysates with high oligopeptide contents. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 51-60, 2008.

58 GRIMBLE, G. K. et al. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. **Clinical Science**, v. 71, n. 1, p. 65-69, 1986.

59 MEGIAS, C. et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3949-3954, 2007.

60 MEGIAS, C. et al. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6509-6514, 2007.

61 VAN DER VEN, C. et al. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6943-6950, 2002.

62 KUMOSINSKI, T. F.; FARRELL, H. M. Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. 6, p. 169-175, 1993.

63 BELTON, P. S. et al. NMR and FTIR studies of hydrated pea proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 4, p. 485-491, 1997.

64 CASAL, H. L.; KOHLER, U.; MANTSCH, H. H. Structural and conformational-changes of beta-lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 957, n. 1, p. 11-20, 1988.

- 65 FORATO, L. A.; BERNARDES, R.; COLNAGO, L. A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 259, n. 1, p. 136-141, 1998.
- 66 BERTRAND, D. et al. Application of principal component analysis to the prediction of lucerne forage protein content and *in vitro* dry matter digestibility by NIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 41, n. 4, p. 299-307, 1987.
- 67 RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; FRY, F. S.; CALVEY, E. M. Use of Fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy for rapid quantification of castor bean meal in a selection of flour-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5169-5177, 2000.
- 68 SASIC, S.; OZAKI, Y. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least squares regression and band assignment. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 64-71, 2001.
- 69 CHASAN, D. E.; NORWITZ, G. **Infrared determination of inorganic sulfates and carbonates by the Pellet technique**. Philadelphia: Department of the Army Frankford Arsenal, 1969. 48 p. (Test Report, T69/ 1-48). Disponível em: <<http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/700126.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2013.
- 70 MILLER, F. A.; WILKINS, C. H. Infrared spectra and characteristic frequencies of inorganic ions - their use in qualitative analysis. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1253-1294, 1952.
- 71 HUG, S. J. *In situ* Fourier transform infrared measurements of sulfate adsorption on hematite in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 188, n. 2, p. 415-422, 1997.
- 72 NORWITZ, G.; CHASAN, D. E. **Application of infrared spectroscopy to the analysis of inorganic nitrates**. Philadelphia: Department of the Army Frankford Arsenal, 1968. 7 p. (Test Report, T68/ 1-7). Disponível em: <<http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=AD0673124>>. Acesso em: 10 jun. 2013.
- 73 TAS, M.; BUYUKGUNGOR, O. Synthesis and structural characterization of a novel peroxo bridged dinuclear cobalt(III) complex of succinimide showing three varieties of hydrogen bonding interactions. **Journal of Chemical Sciences**, v. 121, n. 3, p. 267-273, 2009.
- 74 ADOCHITEI, A.; DROCHIOIU, G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 56, n. 8, p. 783-791, 2011.
- 75 WU, J. P.; ACERO-LOPEZ, A. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 480-487, 2012.

76 MIZUTANI, K. et al. Structure of aluminium-bound ovotransferrin at 2.15 angstrom resolution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 61, p. 1636-1642, 2005.

77 FARIAS, R. F. de. **Para gostar de ler a história da química**. Campinas: Átomo, 2013. p. 15.

APÊNDICE

Trabalhos recentes demonstram que metais podem se coordenar às proteínas, como é o caso do ferro coordenado na ovotransferrina,⁷⁵ mostrado na Figura 45.

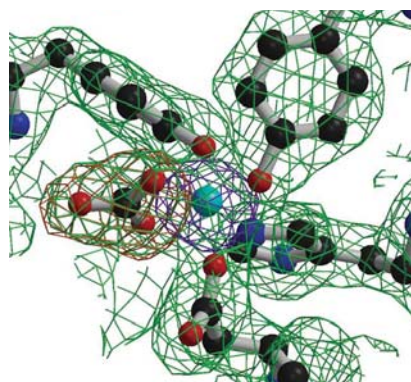
Figura 45 - Coordenação do ferro na ovotransferrina.



Fonte: Wu, (2012, p. 481).

De acordo com Mizutani e colaboradores⁷⁶, aminoácidos podem se coordenar a centros metálicos, e o alumínio pode se coordenar a quatro resíduos de aminoácidos, conforme ilustrado na Figura 46.

Figura 46 - Coordenação do alumínio a 4 aminoácidos.



Fonte: Mizutani, (2005, p. 1641).

Mediante aos fatos supracitados, acredita-se que algo bem parecido deva estar acontecendo também nas amostras sintetizadas nesse trabalho e, uma possível fórmula mínima para a amostra **D** é $[\{\text{Co}(\text{Pept})(\text{aminoácido})_2\}\text{O}_2]\text{NO}_3$.