



Universidade Estadual Paulista – UNESP  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



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

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.

**Aluno:** Francisco Otávio Cintra Ferrarini

**Orientadora:** Prof. Dra. Regina Célia Galvão Frem

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Rubens Monti

**Araraquara**

**2012**

**Francisco Otávio Cintra Ferrarini**

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

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. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Co-Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

**Araraquara**

**2012**

FRANCISCO OTÁVIO CINTRA FERRARINI

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

Araraquara, 23 de agosto de 2012.

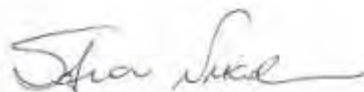
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Regina Célia Galvão Frem Di Nardo (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi  
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas



Profª Drª Sofia Nikolaou  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados Pessoais**

Data de nascimento: 05/01/1979.

Nacionalidade: Brasileira.

Naturalidade: Bragança Paulista - SP.

Filiação:

Darcy Ferrarini.

Anna Maria Cintra Ferrarini.

Endereço:

Av. Dom Carlos Carmelo, 493 - Bloco 11 - Apartamento 24 - Jardim

Botânico - Cep: 14805-070

Telefone: (16) 3336 9614 e (11) 8521 1325.

E-mail: chicoferrarini@yahoo.com.br

### **Formação Acadêmica**

Graduação: Licenciatura em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Dez./ 2005.

### **Atuação profissional**

Professor de Educação Básica, Técnica e Tecnológica do IFSP – Campus Bragança Paulista – SP, 2012.

Professor de Química do COC de Araraquara, Jaú e Matão – SP, 2004, e de 2008 a 2011.

Professor de Química do Curso Objetivo de Araraquara – SP, 2003, 2004 e 2011.

Professor de Química do Curso Etapa, São Paulo – SP, 2006 e 2007.

Professor de Química do Colégio Etapa, São Paulo – SP, 2005 a 2007.

Professor de Química do Curso Pré-Vestibular do Colégio Atibaia / Sistema Etapa de Ensino, Atibaia - SP, 2005 e 2006.

Professor de Química do Curso PROFITEC – Preparatório para as Escolas Técnicas do Estado de São Paulo – SP, 2005.

Professor de Química do Curso Unificado do Campus de Araraquara (CUCA) - Programa de Extensão Universitária da Unesp – SP - 2001, 2003 e 2004.

Professor Coordenador do Curso Comunitário Pré-Universitário Gauss – Atibaia – SP, 2001 a 2004.

Monitor de Química do Curso e Colégio COC de Araraquara – SP, 2003.

Professor Coordenador do Curso Pré - Vestibular da Sociedade Beneficente Casa do Caminho – Atibaia - SP, 2000.

### **Trabalhos em Congressos**

FERRARINI, F. O. C. ; Vitória Gomes Nogueira de Oliveira ; Patrícia Bento da Silva ; Julina C. Bassan ; Antonio Carlos Moro ; Regina Célia Galvão Frem ; Rubens Monti . Obtenção de um quelato de cobre(II) a partir de proteínas hidrolisadas de soro de leite bovino. In: 18 Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista, 2011, São José do Rio Preto. Livro de Resumos Do 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista. v. 18. p. 160.

FERRARINI, F. O. C. ; Antonio Carlos Moro ; Paula S. Haddad ; Antonio Eduardo Mauro ; Ronaldo J. Fernandes ; Regina Célia Galvão Frem . Preparação e caracterização espectroscópica do  $[W(CO)_4]phen$ : Uma prática integrada de Química Inorgânica. In: 18 Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto. Livro de Resumos Do 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011. v. 18. p. 161.

FERNANDES, R. J. ; Edegar Benedetti ; Flávio Flores Aquino ; Bruno Alves Moreira ; FERRARINI, F. O. C. ; Antonio Carlos Moro . Ensino de Química através da Linguagem Teatral: Show da Química - Mágicas. In: 18 Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011, São José do Rio Preto. Livro de Resumos Do 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti", 2011. v. 18. p. 74.

**Bolsas**

Estagiário Bolsista da Seção de Apoio Técnico do Instituto de Química da UNESP Araraquara - SP, 2002. Atividade desenvolvida: Destilação de Solventes e Análise de Solos.

Estagiário Bolsista do Programa de Divulgação Científica para escolas do Ensino Fundamental e Médio desenvolvido pelo Centro de Ciências da UNESP, Araraquara - SP, 2002.

*Dedico a todos aqueles que  
me ajudaram a chegar até aqui*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por interceder diretamente nos meus rumos e tornar da minha jornada um eterno recicar.

Aos meus pais Anna e Darcy, pela confiança e os ensinamentos dispensados, as minhas tias Carmem e Mônica pelo apoio incondicional, aos meus irmãos João e Felipe, amigos para qualquer hora.

À minha namorada Claudia, pelo sentimento partilhado de que: “Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.” - Raul Seixas.

À minha Orientadora Professora Regina, que compreendeu minhas necessidades e limitações, que me permitiu fazer parte de seu grupo de pesquisa, aceitando minha condição enquanto professor de ensino médio e de meus horários escassos. Muito obrigado pela imensa generosidade, boa vontade e ensinamentos dispensados.

Ao meu co-orientador Prof. Rubens Monti, professor por vocação, pela paciência, exemplo de educação, pelos ensinamentos teóricos e de bancada.

Aos colegas dos laboratórios pelos quais passei: da Enzimologia, Juliana, Antonio, Taís e Ozeni; da Bioquímica, Professor Maffud, Lentilha, Araketu, Professora Maria Célia e Eliane; da Analítica, ao meu compadre Eduardão e sua mulher Mayara; aos professores, servidores e técnicos do DGQI, aos alunos Juninho (Porpeta), Elaine, Silmar (Dom Porpetone), Sahra, Cris, Gislaine, Noelle, Ana Paula, Fellipe, Carol, Daniel (Homer), Rodrigo, Victor e o Ronaldinho Pé na Porta. Aos IC's Carol, Aline, Vitória e Caio.

Aos amigos da graduação e/ou Highlanders do DGQI, que salvaram a minha pele em várias circunstâncias e que um simples obrigado não seria o suficiente, Patrícia Bento (pela paciência, ensinamentos, e dedicação), Antonio (companheiro e profeta, com sua frase famosa: “em Boituva o avião que sobe, nunca desce com passageiro”), Marcelo Lahoud (pela disposição nos momentos críticos), Amadeu (pelo incentivo e companheirismo), ao Daniel Bunderman (parceiro acima de tudo) e ao Vinicius (pela força de sempre).

Aos companheiros de República Juquiri - Breton, Pedrão, Juqui, Carlito e Dengue. Aos companheiros da República Aquidauanos e amigos ilustres, André, Lidervan e Sugera.



Ao pessoal de Atibaia, amigos de longa data e de apoio constante, Bentinho, Roberval, Leandro, Fabiano, Erik e Eugênio.

A todos os funcionários do IQ que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

**Veze Versus Reveses (Paulo Leminski)**

*um flash back*

*um flash back dentro de um flash back*

*um flash back dentro de um flash back de*

*um flash back*

*um flash back dentro do terceiro flash back*

*a memória cai dentro da memória*

*pedraflor na água lisa*

*tudo cansa (flash back)*

*menos a lembrança da lembrança da lembrança*

*da lembrança*

## RESUMO

A idéia central deste trabalho consiste em preparar e testar atividade biológica de compostos de cobre contendo hidrolisados do soro do leite bovino, que é uma importante fonte protéica e tem sido via de regra descartado pela indústria de laticínios. A primeira parte deste trabalho envolveu, então, a obtenção do soro do leite, seguida de diálise, tratamento para extração de gordura e hidrólise tendo sido realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. Foram verificadas e propostas formas de hidrólise por vias enzimática e ácida do soro do leite e seus resultados analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Quanto aos processos de hidrólise empregados, mesmo embora ainda não tenhamos conseguido as condições “ideais” (natureza e concentração das enzimas, tempo de reação) para uma hidrólise enzimática completa – o que acarretou na presença de pequenos peptídeos junto com os aminoácidos livres -, a idéia continua sendo a de evitar o uso da hidrólise ácida, porque além de poluir, vai fornecer os aminoácidos que já são conhecidos da literatura. A segunda parte do trabalho foi realizada neste Instituto e está relacionada aos aspectos de síntese dos compostos de coordenação contendo cobre como centro metálico. Verificamos inicialmente que tanto o método da precipitação quanto o da liofilização foram eficientes para a obtenção do hidrolisado no estado sólido, além de terem conduzido essencialmente ao mesmo material de trabalho. Em seguida, foram obtidos com sucesso três compostos distintos e inéditos de cobre, de diferentes valências, a partir da interação entre precursores de cobre(II) e o soro hidrolisado enzimaticamente. As alterações nas rotas sintéticas propostas bem como nas condições experimentais (material de partida, solvente, pH) foram cruciais para que esses resultados pudessem ser alcançados. Tal comportamento deve-se à utilização de um sistema polifuncional que assume grande capacidade de coordenação a centros metálicos e assim sendo, temos a convicção de que novos e importantes compostos serão obtidos de maneira a compor uma lista multimineral a ser testada como metalofármacos ou substâncias nutracêuticas. Além disso, demos início recentemente aos estudos envolvendo a potencialidade de aplicação biológica desses sistemas.

## ABSTRACT

The central idea of this work consists in synthesize, characterize and evaluate the biological activities of copper compounds containing hydrolyzed whey protein since an important protein source and has been disposed by the industry. First, the bovine serum was obtained, dialyzed and treated to remove the fatty acids, and then hydrolyzed at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of UNESP – Araraquara. Enzymatic and acid hydrolysis were prepared and the results were obtained by high performance liquid chromatography (HPLC). The second part of this work was performed in this Institute and concerns about aspects of synthesis and characterization of coordination compounds containing copper as the metallic center. It was initially verified that precipitation as well lyophilization methods were efficient to the preparation of hydrolyzed material in the solid state, besides having conducted essentially to the same material. Then three novel and distinct compounds of copper, in different valences, were successfully obtained from the interaction between copper(II) salts and the enzymatically hydrolyzed whey. Modifications in the synthetic routes as well as in experimental conditions (the starting material, solvent, pH, etc.) were essential for the obtainment of the final results. This behavior is associated to the use of a polyfunctional system that exhibit a great coordination capacity and therefore we expect that new and important compounds could be obtained in order to compose a multimineral shortlist that can be used for pharmaceutical or nutritional purposes. In addition, we have recently begun studies involving the potential biological application of these systems.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

2-ME: 2-mercaptoetanol

3-MPA: 3-ácido mercaptopropiônico

AA: material hidrolisado e isolado via precipitação

AA: soro hidrolisado enzimaticamente

AA2: material hidrolisado e isolado via liofilização

AA2: soro hidrolisado enzimaticamente e liofilizado

Ala: alanina

Arg: arginina

Asp: ácido aspártico

CELANEM: Instituto de Bioquímica, Estudos Metabólicos e Nutrição Aplicada.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cys: cisteína

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio.

DMF: dimetilformamida

DTA : Análise Térmica Diferencial

DTG : Derivada da TG

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético.

EL: Espectroscopia de Luminescência

EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica

EXAFS: Extended X-ray Absorption Fine Structure

FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP

Glu: glutamato

Gly: glicina

His: histidina

Ile: isoleucina

IV: Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Leu: leucina

Lys: lisina

Met: metionina

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NTH: Nova Tentativa de Hidrólise enzimática

OPA: orto-ftalaldeído

PAGE: gel de poliacrilamida

Phe: fenilalanina

Pro: prolina

Ref.: referência

SBA: Soro Albumina Bovina

SDS: detergente dodecilsulfato de sódio

Ser: serina

SH: substâncias húmicas

TCA: ácido tricloroacético

TCLM: transferência de carga do ligante para o metal

TG : Termogravimetria

Thr: treonina

Tyr: tirosina

UV: Ultravioleta

Val: valina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$v$  : estiramento

$v_{as}$  : estiramento assimétrico

$v_s$  : estiramento simétrico

$\phi$ : respiração do anel

$\beta$ : deformação no plano

$\delta_{as}$ : deformação angular assimétrica no plano

$\gamma$ : deformação fora do plano

mF: muito forte

F: forte

M: média

F: fraca

mf: muito fraca

om: ombro

$\lambda$  : comprimento de onda

$\lambda_{exc}$  : comprimento de onda de excitação

$\lambda_{em}$  : comprimento de onda de emissão

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	Importância biológica do cobre .....	21
1.2	Quelatos de metais de transição .....	23
1.2.1	Aminoácidos quelatados.....	24
1.2.2	Levantamento bibliográfico: Aminoácidos quelatados contendo cobre. ....	25
1.3	Soro do leite bovino como fonte natural de ligantes.....	28
1.4	Atividade bacteriostáticas de compostos químicos frente a bactéria causadora do cancro cístico.....	31
2	OBJETIVOS .....	33
3	PARTE EXPERIMENTAL .....	34
3.1	Soro do leite bovino.....	34
3.1.1	Equipamentos .....	34
3.1.2	Reagentes e solventes utilizados .....	34
3.1.3	Obtenção do soro .....	36
3.1.4	Diálise para extração da lactose.....	36
3.1.5	Tratamento com caulim .....	37
3.1.6	Análises.....	38
3.1.7	Hidrólise Enzimática do soro do leite .....	40
3.1.8	Determinação de peptídeos pequenos e aminoácidos .....	40
3.1.9	Eletroforese (SDS-PAGE) para separação de proteínas .....	41
3.1.10	Hidrólise Enzimática – Uma nova tentativa.....	42
3.1.11	Hidrólise ácida do soro do leite.....	43
3.1.12	Liofilização do soro hidrolisado do leite bovino .....	44
3.2	Compostos de cobre contendo hidrolisado de soro de leite.....	45
3.2.1	Sínteses .....	45
3.2.2	Condições reacionais .....	47
3.2.3	Estudo dos compostos de cobre.....	48
3.3	Ensaio de atividade biológica dos compostos de cobre .....	51
3.3.1	Metodologia utilizada .....	52
3.3.2	Condições de estocagem .....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1	Soro do leite bovino.....	53
4.1.1	Dosagem de açúcar redutor no soro do leite hidrolisado via processo enzimático .....	53
4.1.2	Dosagem de proteína .....	54
4.1.3	Eletroforese do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato .....	56



4.1.4	Análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica .....	58
4.1.5	Hidrólise Enzimática .....	58
4.1.6	Uma nova tentativa de hidrólise (NTH) .....	60
4.1.7	Metodologia para obtenção de aminoácidos via hidrólise ácida.....	62
4.2	Compostos de cobre a partir do soro do leite bovino hidrolisado enzimaticamente .....	68
4.2.1	Soro hidrolisado: amostras AA e AA2 (materiais hidrolisados) .....	68
4.2.2	Composto <b>CuSAA2</b> .....	70
4.2.3	Composto <b>CuNAA2</b> .....	73
4.2.4	Compostos <b>CuSDAA2</b> .....	76
4.2.5	Complexometria com EDTA .....	79
4.2.6	Ressonância Paramagnética Eletrônica .....	79
4.2.7	Voltametria Cíclica.....	80
4.2.8	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	82
4.2.9	Espectroscopia de Luminescência .....	83
4.3	Hidrólise ácida completa dos compostos de cobre: tentativa de identificação dos ligantes via análise cromatográfica.....	86
4.4	Ensaio de atividade biológica.....	91
4.4.1	Testes biológicos preliminares: Avaliação de resistência a cobre em Xcc ( <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ).....	91
	PERSPECTIVAS e TRABALHO FUTUROS.....	94
	CONCLUSÃO .....	94
	APÊNDICE.....	99
	REFERÊNCIAS.....	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura proposta para o complexo $[M(C_{26}H_{16}N_8)X_2]^5$ .....	23
Figura 2.	EDTA coordenado a um centro metálico hexa-coordenado.....	24
Figura 3.	Estrutura do complexo aniônico $[Cu(Glu)_2]^{2-}$ (Glu=glutamato). ....	24
Figura 4.	Principais aminoácidos presentes no hidrolisado do soro de leite bovino. ...	30
Figura 5.	Diálise para retirada de lactose. ....	37
Figura 6.	Eletroforese. (a) amostras do soro em diferentes tempos de hidrólise são carregadas nos poços do PAGE. As proteínas movem-se para o interior do gel quando é aplicado um campo elétrico; (b) As proteínas podem ser visualizadas após a eletroforese por tratamento do gel com Comassie Brilliant Blue. Peptídeos pequenos migram para a extremidade inferior do gel. ....	42
Figura 7.	Hidrólise ácida. (a) erlenmeyer para recolhimento de HCl; (b) e (c) condensadores para liberação de ácido e refluxo do material submetido à hidrólise ácida, respectivamente; (d) balão de três bocas; (e) entrada de $N_2$ ; (f) manta térmica e agitador magnético; (g) escape de $N_2$ . ....	43
Figura 8.	Fluxograma ilustrativo do procedimento de precipitação do hidrolisado a partir de hidrolisado de soro de leite bovino. ....	44
Figura 9.	Material liofilizado.....	45
Figura 10.	(a) Filtração em atmosfera de nitrogênio; (b) composto selado a vácuo em ampola de vidro.....	47
Figura 11.	Curva de titulação do ácido glutâmico ( $pK_R = pK_a$ do grupo R) <sup>24</sup> . ....	48
Figura 12.	Aspecto do eletrodo de trabalho adequado para uso de pasta de carbono. ....	50
Figura 13.	Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite. ....	53
Figura 14.	Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite. ....	55
Figura 15.	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. ....	56
Figura 16.	Exemplo de reação de derivatização.....	58
Figura 17.	Aminograma obtido em CLAE para o soro hidrolisado enzimaticamente.....	59
Figura 18.	Aminograma padrão (mistura de 16 aminoácidos) obtido em CLAE.....	60
Figura 19.	Aminograma obtido em CLAE para amostra NTH. ....	61
Figura 20.	Aminograma padrão obtido em CLAE. ....	62
Figura 21.	Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em $t = 0$ . ....	63
Figura 22.	Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em $t = 12$ horas. ...	64
Figura 23.	Aminograma obtido em CLAE em alíquota retirada em $t = 24$ horas. ....	65
Figura 24.	Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em $t = 36$ horas. ...	66
Figura 25.	Espectros vibracionais na região do IV dos compostos AA2 e AA (KBr). ....	69
Figura 26.	Espectros vibracionais no IV dos compostos CuSAA2 e AA2 (em pastilhas de KBr).....	71
Figura 27.	Espectros vibracionais no IV dos compostos CuNAA2 e AA2 (em pastilhas de KBr).....	74
Figura 28.	Espectros vibracionais no IV dos compostos CuSDAA2 e AA2 (em pastilhas de KBr).....	77
Figura 29.	Espectro EPR dos compostos de cobre(II) CuSAA2. ....	80
Figura 30.	Voltamogramas cíclicos de $[Cu^I Cl(PPH_3)_3]$ (a); $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (b).....	81
Figura 31.	Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono modificado com os complexos CuSDAA2 (a) e CuNAA2 (b). ....	81

Figura 32. (a) Ampola selada sob atmosfera inerte, CuNAA2 apresenta tonalidade alaranjada. Em (b), o material com tonalidade verde escuro, resultado da oxidação em sistema aberto.....	82
Figura 33. Imagens MEV de CuNAA2 com ampliação de 5.000 vezes (a); 10.000 vezes (b). .....	82
Figura 34. Imagens MEV de CuSAA2 com ampliação de 2.000 vezes (a); 5.000 vezes (b). .....	83
Figura 35. Espectro de excitação ( $\lambda_{em} = 435,5nm$ ) do composto CuNAA2 (fenda de excitação e emissão, respectivamente, iguais a 1 e 2 nm; incremento de 1 nm/s com tempo de integração de 0,25 s).....	84
Figura 36. Espectro de emissão ( $\lambda_{exc} = 370 nm$ ) do composto CuNAA2 a temperatura ambiente (fenda de excitação e emissão respectivamente de 2 e 5 nm, incremento de 1 nm/s com tempo de integração de 0,25s).....	85
Figura 37. Espectro de emissão ( $\lambda_{exc} = 360 nm$ ) do complexo de cobre(I) obtido por Starosta et. al. à temperatura ambiente <sup>56</sup> . .....	85
Figura 38. Aminograma do produto da hidrólise do composto CuNAA2 .....	87
Figura 39. Aminograma do produto da hidrólise do composto CuSDAA2.....	88
Figura 40. Aminograma do produto da hidrólise do composto CuSAA2 .....	89
Figura 41. Estrutura primária da $\beta$ -lactoglobulina A (diferenciando-se das variantes B e C) <sup>28</sup> .....	90
Figura 42. Crescimento celular para a linhagem FB04 de <i>Xcc</i> , em meio Nutriente Agar tamponado, sem cobre e com os compostos CuSAA2, CuNAA2 e CuSDAA2 nas concentrações 410, 2820 e 906 $\mu g \cdot mL^{-1}$ .....	92
Figura 43. Crescimento celular para linhagens de <i>Xcc</i> , indicada na figura, em meio Nutriente tamponado, sem cobre e com $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ nas concentrações de 62,5; 125,0; 187,5 e 250,0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ .....	93
Figura 44. Abordagem analítica para determinar a capacidade de complexação do soro do leite bovino hidrolisado enzimaticamente por metais de interesse	97
Figura 45. Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuSAA2. ....	99
Figura 46. Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuNAA2. ....	100
Figura 47. Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuSDAA2.....	101
Figura 48. Isomeria <i>cis-trans</i> para cobre(II) coordenado a um aminoácido genérico, com cobre apresentando geometria quadrado planar <sup>61</sup> . .....	102
Figura 50. Fórmula estrutural proposta para o composto CuSAA2, com geometria ao redor do cobre na forma quadrática plana.....	102
Figura 51. Compostos organometálicos de cobre com sulfato coordenado <sup>62</sup> .....	103
Figura 52. Fórmula estrutural proposta para o composto CuNAA2 de composição estequiométrica $[CuL]_n$ . .....	104
Figura 53. Composto $\{[Ag_2(3,3'-pytz)_3]^+ \}_n$ . .....	104
Figura 54. Possibilidade estrutural para o composto binuclear CuSDAA2.....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição elementar média de um adulto de 70 kg de peso. ....	21
Tabela 2.	Levantamento bibliográfico para compostos de cobre com aminoácidos coordenados. ....	25
Tabela 3.	Distribuição das principais proteínas no soro do leite bovino, concentrações em g·L <sup>-1</sup> e percentagens médias. ....	29
Tabela 4.	Composição em aminoácidos do hidrolisado do soro de leite bovino. ....	30
Tabela 5.	Reagentes e solventes utilizados. ....	35
Tabela 6.	Quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite ..	54
Tabela 7.	Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento. .	55
Tabela 8.	Concentração de alguns aminoácidos com áreas determinadas em função do tempo de hidrólise. ....	67
Tabela 9.	Principais frequências vibracionais no IV (cm <sup>-1</sup> ) referentes aos compostos <b>AA</b> e <b>AA2</b> e suas respectivas atribuições . ....	70
Tabela 10.	Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm <sup>-1</sup> ) referentes aos compostos <b>CuSAA2</b> e <b>AA2</b> e suas respectivas atribuições. ....	72
Tabela 11.	Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm <sup>-1</sup> ) referentes aos compostos <b>CuNAA2</b> e <b>AA2</b> e suas respectivas atribuições . ....	75
Tabela 12.	Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm <sup>-1</sup> ) referentes aos compostos <b>CuSDAA2</b> e <b>AA2</b> e suas respectivas atribuições . ....	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância biológica do cobre

A presença de cobre é essencial no organismo dos seres vivos. A importância deste metal foi primeiramente reconhecida em 1920 quando Hart *et al*<sup>1</sup>. Realizando experimentos com ratos nutridos essencialmente com regime lácteo, evidenciaram que o cobre era necessário para o combate da anemia ferropriva (80% dessas apresentam, concomitantemente, deficiência de cobre e zinco), sendo este integrante no metabolismo do ferro e na síntese da hemoglobina, sendo necessário na incorporação do ferro ao grupamento heme. A partir desta descoberta, seguiu-se o reconhecimento do cobre como elemento-traço para o desempenho de certas funções biológicas, sendo este um cofator que participa como centro ativo para muitas enzimas como a citocromo oxidase. Biomoléculas que contém esse metal são responsáveis por funções primordiais nos organismos vivos como transporte de elétrons, metabolismo de oxigênio e oxidação de substratos.

A importância do cobre é evidenciada pela sua quantidade no organismo humano, sendo esse o terceiro elemento de transição em maior abundância, sendo antecedido apenas por ferro e zinco<sup>2</sup>, conforme podemos observar na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição elementar média de um adulto de 70 kg de peso.

	Elemento	g / 70 kg de peso
Elementos-traços	Fe	4,2
	Zn	2,3
	Cu	0,1

Clinicamente, os baixos níveis de cobre estão associados a vários tipos de distúrbios como retardo no crescimento, carência proteica, lesões cardiovasculares, aterosclerose, síntese fosfolipídica imperfeita, dermatoses, diminuição da produção de melanina, desmineralização, fraturas e deformações nos ossos, hipercolesterolemia, alterações no metabolismo da tireóide, dores articulares e baixa imunidade<sup>1</sup>.

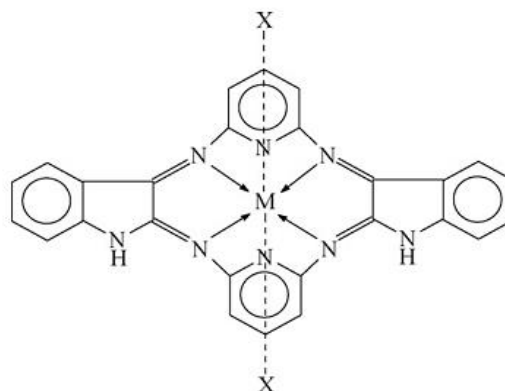
O reconhecimento das atividades biológicas do cobre estimula, então, o desenvolvimento de compostos de coordenação envolvendo este metal e uma série de ligantes, dentre os quais aqueles biologicamente ativos.

Shoukry *et al*<sup>3</sup>, com base no fato de que cobre (II) é o centro ativo de algumas enzimas, sintetizaram complexos binários e ternários deste metal envolvendo a N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (Me<sub>4</sub>tmen) e os seguintes ligantes: ácidos dicarboxílicos, aminoácidos, peptídeos e unidades componentes do DNA. O objetivo dos autores era usar o impedimento estérico causado pela etilenodiamina para estabilizar o centro metálico, controlando, assim, a reatividade destes compostos para sua posterior utilização em processos catalíticos e biológicos. Os resultados mostraram a formação de complexos com aminoácidos e ácidos dicarboxílicos de estrutura [Cu(Me<sub>4</sub>en)(L)], enquanto que com peptídeos, as correspondentes espécies desprotonadas [Cu(Me<sub>4</sub>en)(LH<sup>-1</sup>)] foram obtidas.

A hepcidina é um hormônio peptídico cuja função é regular o metabolismo do ferro em humanos e outros mamíferos, e sua importância biológica influenciou os estudos de Tselepis *et al*<sup>4</sup>. O hormônio possui cinco cadeias N-terminais de aminoácidos, e evidências recentes sugerem que estes são de grande importância para a existência da função biológica. Os autores estudaram, então, a possibilidade desta região ligar-se a íons divalentes; um desses íons foi o cobre(II). O estudo mostrou que a hepcidina-25 forma complexos com cobre(II) quando algumas condições são satisfeitas, resultando em compostos cuja relevância biológica é grande devido à possibilidade da hepcidina vincular cobre *in vivo*.

Além das funções biológicas do cobre acima citadas, a atividade antibacteriana deste metal complexado tem sido também reportada, como no trabalho realizado por Singh *et al*<sup>5</sup>, onde foram comparados os resultados da ação do mesmo sobre as cepas *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), *Bacillus subtilis* (MTCC121), *Escherichia coli* (MTCC 1652), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC741) com o antibiótico padrão ciprofloxacina. Utilizando a reação de condensação da 2,6-diaminopiridina com isatina na presença de metais divalentes, os autores obtiveram nove compostos com a fórmula geral [M(C<sub>26</sub>H<sub>16</sub>N<sub>8</sub>)X<sub>2</sub>] onde M= Cu(II), Co(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) e X= Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> (Figura 1).

**Figura 1.** Estrutura proposta para o complexo  $[M(C_{26}H_{16}N_8)X_2]$  <sup>5</sup>.



Dos complexos obtidos, o composto  $[Cu(C_{26}H_{16}N_8)OAc_2]$ , foi o mais ativo na ação inibitória destes microorganismos <sup>5</sup>.

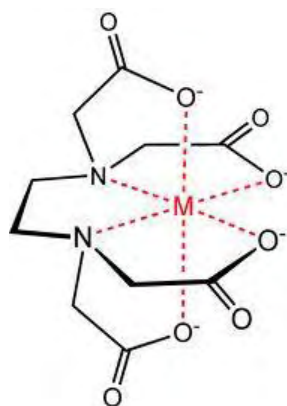
## 1.2 Quelatos de metais de transição

São denominados quelatos os compostos formados por íons metálicos coordenados a moléculas que possuam mais do que um átomo doador, como aminoácidos, peptídeos ou complexos polissacarídeos. A palavra "quelatos" vem do grego "*chele*" que significa "*garra*", um termo adequado para descrever a maneira na qual os íons metálicos polivalentes se coordenam a essa classe de ligantes. A formação desses anéis quelatos proporciona, em geral, alta disponibilidade biológica aos íons metálicos, além de estabilidade e solubilidade bastante favorecidas.

Recentemente, estudos com minerais orgânicos ou quelatados são 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 <sup>6</sup>.

A quelação mineral é muito importante nos sistemas biológicos. Como exemplo podemos citar o EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), apresentado na Figura 2, que é um ligante hexadentado utilizado para a remoção de metais pesados em tecidos animais <sup>7</sup>.

**Figura 2.** EDTA coordenado a um centro metálico hexa-coordenado.

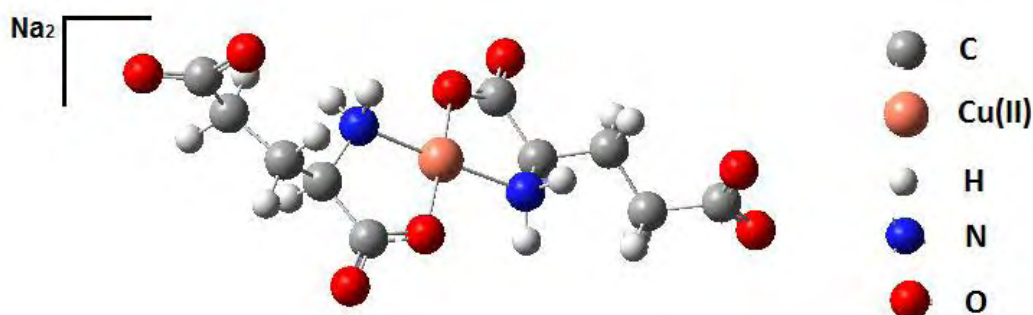


### 1.2.1 Aminoácidos como ligantes quelantes

Pelo fato dos aminoácidos serem bioquimicamente importantes, podendo formar, também, complexos com anéis de cinco ou seis membros quando coordenados a centros metálicos, eles podem ser utilizados como ligantes quelantes para metais, pois estes contêm grupos terminais amina e carboxílicos que favorecem a formação do quelato <sup>8</sup>.

Uma possível estrutura de quelato metálico é apresentado na Figura 3.

**Figura 3.** Estrutura do complexo aniônico  $[\text{Cu}(\text{Glu})_2]^{2-}$  (Glu=glutamato).



Em geral, elementos minerais quelatados apresentam biodisponibilidade maior ou comparável àquelas na forma de sulfato ou óxido <sup>6</sup>.

Visando controlar a anemia ferropriva em adolescentes, o CELANEM em parceria com a Universidade de São Paulo desenvolveu estudos para a produção de quelatos de ferro a serem incorporados na alimentação, como é o caso do arroz fortificado, controlando o desenvolvimento da patologia. Sendo assim, a



administração do arroz fortificado com ferro bis-glicina quelato em duas creches do Estado de São Paulo apresentou resultados satisfatórios, sendo que a anemia ferropriva foi reduzida em aproximadamente 40% <sup>9</sup>.

### 1.2.2 Levantamento bibliográfico: aminoácidos quelatados contendo cobre.

A Tabela 2 apresenta levantamento bibliográfico para aminoácidos quelatados contendo cobre, o tipo de análise empregada e alguns itens considerados relevantes como procedimentos experimentais, interpretações no IV, EPR e propriedades químicas de quelatos de cobre com aminoácidos.

**Tabela 2.** Levantamento bibliográfico para compostos de cobre com aminoácidos coordenados.

Ligantes envolvidos	Tipo de estudo realizado	Destaques	Ref.
Metionina, Fenilalanina e Triptofano	Análise elementar, TG, DTG, absorção atômica, IV, UV-Vis e espectroscopia de EPR.	Parte experimental: Uso de NaOH 30% nas sínteses para obter condições de ionização dos aminoácidos. Proporção 2 Ligante : 1Metal. H <sub>2</sub> O usada como solvente. Possibilidade de comparação entre resultados obtidos nas diversas técnicas de caracterização dos complexos de aminoácidos.	10
Alanina, Fenilalanina, Glicina e outros ligantes	Relato da síntese de seis novos compostos de Cu(II), com posterior análise cristalográfica e estudos magnéticos.	Para os compostos relatados no artigo podemos observar os aminoácidos como os responsáveis pela natureza polimérica da espécie de Cu(II), visto que coordenam-se via modos quelante e ponte entre dois átomos distintos de cobre(II).	11
Ácido aspártico, Serina e Valina	Análise elementar, titulações, além de dados de TG e IV.	O artigo cita as dificuldades de se trabalhar com misturas de aminoácidos em reações de complexação. Compostos binários e ternários de cobre(II) com ácido aspártico, serina e valina foram preparados por processos eletroquímicos e químicos (na proporção 1:1:1). De acordo com os espectros no IV, todos os complexos contêm um anel quelatado de cinco membros em que o átomo de Cu (II) é ligado com o átomo de oxigênio do grupo carboxila e o átomo de nitrogênio do grupo amino.	12

Alanina, Lisina, Metionina, misturas de ligantes e de metais	Síntese e caracterização por análise elementar, IV, espectros eletrônicos susceptibilidade magnética e espectros de EPR.	As medidas de susceptibilidade magnética e espectros eletrônicos foram utilizadas para inferir que as estruturas dos complexos de Cu(II) são tetraédricas. Utilizando espectros de EPR inferiu-se que os complexos de cobre apresentam estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ com pequenos valores de $g_{\parallel}$ indicando uma forte interação entre os ligantes e os íons de metal.	13
Complexos ternários utilizando Metionina e nucleotídeos e com Triptofano e nucleotídeos	Análise elementar, IV, voltametria cíclica, espectros de EPR.	A formação dos complexos ternários com metais bivalentes-nucleotídeos e aminoácidos como tirosina, histidina além de outros aminoácidos com cadeias laterais aromáticas é favorecida pelas interações $\pi$ - $\pi$ . Muitas tentativas resultaram em complexos binários do tipo: M-aminoácido. Análise comparativa da interpretação dos resultados relatados.	14
Ácidos hidroxâmicos (ligantes primários) e os aminoácidos glicina e histidina (ligantes secundários)	Estudo potenciométrico e espectrofotométrico de complexos mistos de Cu(II).	As estruturas mais prováveis das espécies mistas são propostas com base nas constantes de formação calculadas nas estabilizações correspondentes, bem como nos espectros de absorção no visível. Neste trabalho são estabelecidos passos para a realização das análises.	15
Glicina, Alanina, Valina, Isoleucina, Metil Glicina, Fenil Glicina, Dimetil Glicina	IV	Nos aminoácidos e em seus quelatos, as frequências do estiramento assimétrico da carboxila são muito próximas das frequências de deformação $NH_3^+$ e $NH_2$ . A fim de evitar quaisquer atribuições errôneas e erros de frequência devido à sobreposição dessas bandas, as frequências do estiramento da carboxila foram obtidas a partir de sólidos recristalizados. É feita a distinção da banda referente ao estiramento simétrico da carboxila que se estende pela deformação degenerada da vibração $CH_3$ . O trabalho estabelece a relação entre as frequências dos estiramentos da carboxila e a força da interação metal oxigênio. Ressalta-se que as frequências também são sensíveis aos efeitos das ligações hidrogênio sobre os grupos carboxila.	16

<p>O ligante utilizado é o tripeptídeo glutationa (constituído de três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina)</p>	<p>Espectro UV-Vis, EPR, pH para definir composição e constantes de formação dos complexos.</p>	<p>A complexação de peptídeos representa uma possibilidade dentro da quelação dos componentes do soro do leite, pois podem haver resíduos no processo de hidrólise total. Neste trabalho ressalta-se que a formação de complexos de cobre (II) com glutationa oxidada difere consideravelmente dos di e tri peptídeos ordinários, pois os últimos são coordenados ao Cu (II) através do peptídeo desprotonado. A forma reduzida dimerizada da glutationa é ligada ao íon metálico resultando um tipo de bis-aminoácido quelato.</p>	<p>17</p>
<p>Ácido Glutâmico e outros ligantes</p>	<p>IV, voltametria cíclica em solução de DMF, EPR e análise elementar.</p>	<p>Os resultados do trabalho indicam que mesmo para moléculas relativamente pequenas, existe um diferencial no encapsulamento do íon metálico para os diferentes complexos obtidos. Isto enfatiza o importante papel que uma superestrutura orgânica pode ter (mesmo em quantidades relativamente pequenas) para proteger e modificar as propriedades dos íons metálicos dentro de metaloproteínas e enzimas.</p>	<p>18</p>
<p>Ácido glutâmico e ácido aspártico</p>	<p>Titulações para medida de pH e posterior cálculos das constantes de dissociação.</p>	<p>O ácido aspártico é um ligante quelante tridentado, desta forma, coordena-se ao íon metálico que ficará blindado e impossibilitado de participar de reações de substituição. Em relação aos complexos de glutamato, frisa-se que o íon <math>\text{Cu}^{2+}</math> é capaz de apresentar interações adicionais com esta espécie. Isto leva a construção de macro-quelato.</p>	<p>19</p>
<p>Histidina e glicina</p>	<p>Revisão dos estudos de difração de raios X e EXAFS para complexos: complexos de Cobre-Histamina e Cobre-histamina glicina</p>	<p>Cita-se que o cobre(II) apresenta grande estabilidade na coordenação com nitrogênio e que a histidina pode atuar como ligante monodentado ou bidentado. O tipo de coordenação é determinado por fatores como a proporção de metal e o pH da solução, pois este interfere no grau de protonação dos átomos de coordenação. Este trabalho inova nos aspectos relacionados a determinação dos sítios de ligação metal-ligante em meio semelhante à dos líquidos fisiológicos.</p>	<p>20</p>

Treonina e derivados	Estudos comparativos de espectros de EPR em função do pH e temperatura.	Referência a fraca capacidade das cadeias laterais dos aminoácidos em se coordenar ao cobre(II). Confirmação da técnica de EPR como método de obtenção de informações detalhadas sobre a natureza da esfera de coordenação de cobre (II) e o número de espécies em solução. O EPR confirma, segundo exposto, que uma série de compostos cobre(II) -aminoácidos apresentam isômeros cis e trans na esfera de coordenação do cobre (II).	21
Tirosina, histidina e outros ligantes	IV	Este artigo inova na maneira de propor a coordenação entre metal e aminoácido: covalentemente os ligantes são ancorados em um apoio (poliestireno) e na sequência são preparados os complexos pela adição de íons metálicos. Posteriormente é adicionado excesso de aminoácidos para a modificação dos polímeros alvo.	22
Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilglicina, Fenilalanina	Uso de calorímetro para determinação dos calores de formação dos complexos obtidos.	São descritos procedimentos de preparação de complexos metal aminoácidos.	23

### 1.3 Soro do leite bovino como fonte natural de ligantes

Com o aumento da produção de queijos pelas indústrias de laticínios, torna-se necessário o aproveitamento do subproduto desse processo isto é, do soro líquido também conhecido como soro de queijo ou soro de leite <sup>24</sup>.

Este soro vem sendo utilizado há muito anos na alimentação animal ou descartado em corpos d'água, causando a destruição da flora e da fauna devido ao seu alto valor de DBO, que é cerca de 30.000 a 50.000 mg·L<sup>-1</sup>. 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 <sup>25</sup>. Cada vez mais, portanto, a legislação ambiental exige das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro <sup>26</sup>.

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte

sólida), sendo que, deste total, 70% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 9% gordura e 11% sais minerais <sup>27</sup>.

O soro do queijo é uma mistura de diversas proteínas que contém uma larga classe de propriedades químicas, físicas e funcionais.

A Tabela 3 compila informações quantitativas acerca do soro do leite propostas por Sgarbieri e Haraguchi <sup>28, 29</sup>.

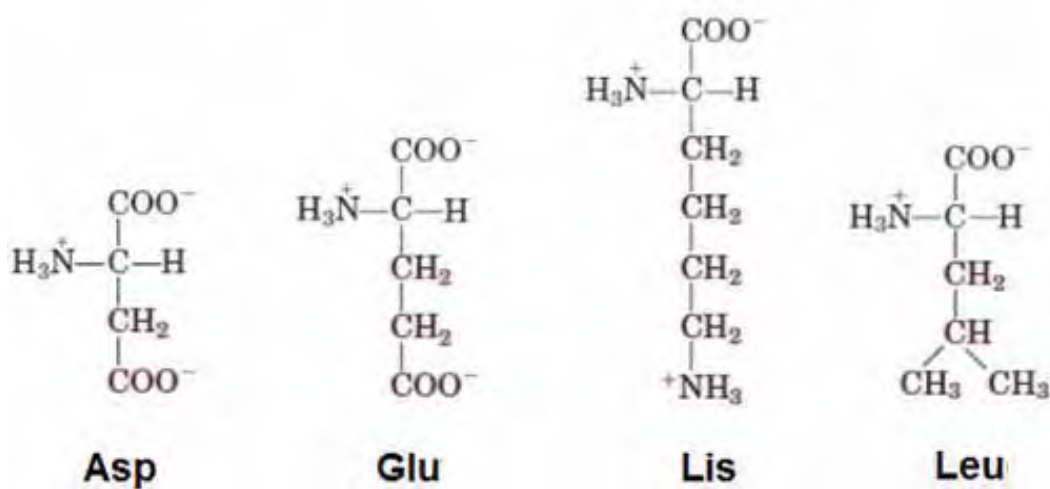
**Tabela 3.** Distribuição das principais proteínas no soro do leite bovino, concentrações em g·L<sup>-1</sup> e percentagens médias.

Proteínas do soro	g·L <sup>-1</sup>	Percentagens médias (%)
$\beta$ -lactoglobulina	3,2	45 - 57
$\alpha$ -lactalbumina	1,2	15 - 25
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	10
Imunoglobulinas	0,7	-
Lactoferrina	0,1	-
Lisozima	Desprezível	-

Procedimentos de hidrólise permitem a obtenção dos aminoácidos constituintes destas proteínas para que possam ser aproveitados posteriormente e é dentro desse contexto que se insere a idéia deste projeto, que visa a utilização destes como ligantes em compostos de coordenação contendo elementos metálicos bioativos. A dificuldade, no entanto, está no estudo dos complexos obtidos, uma vez que a variedade de aminoácidos no soro é grande.

Pacheco *et al.* <sup>30</sup>, após realizarem a hidrólise do soro de leite, obtiveram a composição de aminoácidos e os que se apresentam em maior concentração são: Asp, Glu, Leu e Lis, cujas fórmulas estruturais estão ilustradas na Figura 4.

**Figura 4.** Principais aminoácidos presentes no hidrolisado do soro de leite bovino.



A composição completa do hidrolisado do soro está compilada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição em aminoácidos do hidrolisado do soro de leite bovino <sup>30</sup>.

Aminoácidos	Quantidade presente no soro hidrolisado (g/100g de proteína)
Asp	10,57
Thr	6,88
Ser	5,57
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

Sendo assim, o presente estudo apresenta, também, uma vertente desta linha de pesquisa de suplementação alimentar, unindo a frente de quelação de metais e a incorporação de aminoácidos por organismos vivos.

#### **1.4 Atividade bacteriostáticas de compostos químicos frente a bactéria causadora do cancro cítrico**

*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*<sup>31</sup>, anteriormente classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ou *Xcc*, é a bactéria responsável pelo cancro cítrico no Brasil e em todo o mundo, juntamente com outras espécies do gênero e tem sido objeto de crescente interesse devido à sua ação fitopatogênica em culturas economicamente importantes. Tendo em vista os prejuízos econômicos causados por *Xcc* em culturas de citros, a conclusão do sequenciamento do seu genoma<sup>32</sup> representou uma contribuição importante para a agricultura de vários países, entre eles o Brasil, pois vem possibilitando um grande avanço no conhecimento do microrganismo e das interações moleculares com o hospedeiro.

A identificação da seqüência do genoma da bactéria *Xcc* abriu a possibilidade de investigar os mecanismos celulares básicos desta espécie. Os genes identificados por anotação do genoma, CopA e CopB, codificam homólogos de proteínas envolvidas na resistência ao cobre. Um ensaio de expressão de genes (transferência de Northern) revelou que a CopA e CopB são expressas como um único transcrito especificamente induzido por cobre. A síntese dos produtos do gene também foi induzida por cobre, atingindo nível máximo quatro horas após a adição de cobre ao meio de cultura.

CopA é uma proteína citosólica e CopB foi detectada na membrana citoplasmática. O gene que codifica a CopA foi interrompido pela inserção de um transposição (ou transpóson, são seqüências de ácido desoxirribonucleico capazes de se movimentar de uma região para outra num genoma de uma célula), levando a conclusão de que as estirpes mutantes eram incapazes de crescer em meio de cultura contendo cobre, mesmo com a menor concentração de CuSO<sub>4</sub> testada (0,25 mM), enquanto que a estirpe do tipo selvagem foi capaz de crescer na presença de 1 mM de cobre. As suspensões de células das estirpes de tipo selvagem e mutante em diferentes concentrações de cobre foram inoculadas em folhas de limão para analisar a sua capacidade para induzir os sintomas de cancro cítrico. Células de

estirpes mutantes apresentaram maior sensibilidade do que a estirpe do tipo selvagem, na presença de cobre, isto é, elas não foram capazes de induzir sintomas de cancro cítrico em concentrações elevadas de cobre e exibiu um crescimento mais retardado em plantas <sup>33</sup>.

Da mesma forma que compostos de cobre foram testados em bactérias responsáveis pelo cancro cítrico, os materiais resultantes das sínteses realizadas neste trabalho também os foram, na tentativa de avaliar a ação inibitória no crescimento das mesmas.



## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos principais:

- Síntese e estudo de compostos de íons cobre contendo hidrolisados protéicos do soro do leite bovino;
- Avaliação da atividade antimicrobiana em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ou *Xcc*, que é a bactéria responsável pelo cancro cítrico no Brasil e em todo o mundo.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 SORO DO LEITE BOVINO**

##### **3.1.1 Equipamentos**

Centrífuga refrigerada (Eppendorf) Centrífuga analítica (Fanem Excelsa Baby II Modelo 206-R); Banho Maria, com agitação e aquecimento Dubnoff (Marconi); pHmetro (Micronal B-374); Espectrofotômetro (Utrospec 1000) 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. Microscópio de alta resolução (TOPCON SM-300) operando entre 10 e 20 kV.

##### **3.1.2 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 catalogados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Reagentes e solventes utilizados.

<b>Reagentes e Solventes</b>	<b>Procedência</b>
Acetato de amônio	Merck
Acido 3-5' dinitrosalicílico (DNS)	Sigma-Aldrich
Acido acético	Synth
Acido Ascórbico	Merck
Acido Clorídrico	J.T. Backer
Acido tricloraocético	Sigma-Aldrich
Acrilamida	Merck
Bisacrilamida	Merck
Carbonato de sódio	Merck
Carbonato de sódio	Sigma-Aldrich
Carboxipeptidase	Novo Nordisk
Caulin	Reagen
Cloreto de cobre dihidratado	Riedel-de-Haen
Comassie Brilliant Blue	Sigma
Dimetilsulfóxido	Aldrich
Dimetilformamida	Merck
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Sigma
Etanol	Merck
Extrato biliar	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich
Glicina	Sigma
Hidróxido de amônio	Merck
Hidróxido de sódio	Merck
Kit com marcadores de massa molecular	Amersham Biociences GE.
Lactose	Riedel
Leite C	Cooperativa de Laticínios São Carlos
Membranas	Hoester
Metanol	Tedia
Nitrato de Cobre(II)	Merck
Oleo Mineral	Nujol
Metanol	Synth
Pancreatina	Sigma-Aldrich
Pepsina	Merck
Persulfato de amônio	Merck
Quimotripsina	Sigma
Renina comercial de <i>Aspergillus Niger</i>	Estrela.
Resinas para cromatografia de troca iônica DEAE-Trysacril e de separação Sephadex G -25	Sigma
Soro albumina bovina	Sigma
Sulfato de cobre pentahidratado	Synth
Tartarato de sódio-potássio	Sigma
Temed	Sigma
Tetra-hidrofurano	Merck
Tirosina	Sigma
Tripsina	Novo Nordisk
Tris-HCl	Vetec

### **3.1.3 Obtenção do soro** <sup>34</sup>

Para cada litro de leite pasteurizado foram necessários 6,0 mL de renina (coalho comercial) e 10 mL de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Após a adição do coagulante e do sal ao leite, homogeneizou-se o sistema obtido em banho-maria (35 °C). Decorrido o tempo de coagulação, cortou-se a massa em cubos pequenos para a liberação do soro. Separou-se o soro da massa (caseína) em um funil recoberto por gaze de modo que não houvesse partículas visíveis de caseína no soro filtrado. Para cada litro de leite obtêm-se de 600 a 700 mL de soro. O soro utilizado para a hidrólise enzimática teve a lactose e a gordura extraídas a níveis de não interferência na quantificação e/ou separação das proteínas, conforme descrito no item 3.1.6 a seguir.

### **3.1.4 Diálise para extração da lactose**

As membranas de diálise passam por tratamento prévio para a retirada da glicerina. Em um recipiente grande de inox foram colocadas água e 1,00g de EDTA. As membranas foram fervidas por 10 minutos e em seguida colocadas por 30 minutos em álcool 50%. Em um béquer de quatro litros, adicionou-se água destilada com 2,00g de bicarbonato de sódio e 1,00 g de EDTA, mantendo-se em repouso por uma noite para posterior lavagem com água destilada (interior e exterior). Finaliza-se o processo armazenando-as em água destilada com 1 mmol de azida sódica em frasco de vidro tampado, sob refrigeração. As membranas antes do uso foram lavadas em água corrente (interior e exterior) para retirada da azida, em seguida, efetuou-se a diálise para retirada de lactose. Com auxílio de um funil, as membranas foram, então, preenchidas com o soro e amarradas pela ponta para remoção do ar (ver Figura 5 a). A diálise é realizada em água destilada, sob refrigeração e constante agitação por um período de dois dias com três trocas de água diárias (Figura 5 (b) - 5 (e)). Ao final do processo, são retiradas amostras para a dosagem de lactose e proteínas (ver Figura 5f).

**Figura 5.** Diálise para retirada de lactose.



### 3.1.5 Tratamento com caulim <sup>34</sup>

O Caulim é utilizado após a diálise para a retirada de gordura. Sendo constituído por um grupo de silicatos de alumínio hidratados, possui entre outras funções a de adsorção. No caso do soro é utilizado para adsorção da gordura na proporção de 0,6 g de caulim/ 30 mL de soro. O tratamento deve ser realizado logo após a diálise e as proporções verificadas. O sistema deve ser homogeneizado e mantido sob refrigeração por 24 horas. A filtração é realizada para retirar o caulim e concomitantemente a gordura, para isso é utilizado funil de Büchner e papel de filtro.

### 3.1.6 Análises

Foram dosadas a proteína <sup>35, 36</sup>, a lactose <sup>37</sup> e gordura <sup>38</sup>, segundo as descrições a seguir.

#### **Método de Lowry - Proteínas totais** <sup>35, 36</sup>

O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre redução ao reagir com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

O mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas, peptídeos ou aminoácidos ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

Este método utiliza como reagentes as seguintes soluções:

- Solução A: carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio  $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- Solução B: tartarato de sódio e potássio 1% em água destilada
- Solução C: sulfato de cobre 1% em água destilada

No momento do uso, as soluções foram misturadas na proporção de 50 mL de solução A; 0,5 mL de B e 0,5 mL de C.

Para a dosagem das proteínas do soro, foram realizadas diluições do soro em água destilada, para um volume final de 0,5 mL. A estas diluições foram adicionados 2,5 mL da mistura das soluções A, B e C citadas acima. As misturas resultantes foram fortemente agitadas e mantidas em repouso por quinze minutos, sendo adicionadas a 0,25 mL de Folin- Ciocalteu  $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Após trinta minutos, foram realizadas leituras a 540 nm. Para a determinação quantitativa foi utilizada curva de calibração com soro albumina bovina (Sigma) como padrão.

#### **Determinação da concentração de lactose** <sup>37</sup>.

A concentração de açúcar redutor (lactose) foi determinada pelo método de Miller <sup>37</sup> que consiste em uma reação colorimétrica de oxirredução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) na presença de açúcares redutores, ocorrendo mudança de

cor, com leitura em  $\lambda=540$  nm. Em meio alcalino, o açúcar redutor reduz o DNS a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que o grupamento aldeído é oxidado a ácido aldônico. O ácido 3-amino-5-nitrossalicílico é um produto de cor laranja. Foi construída também uma curva de calibração de lactose para determinação do coeficiente de extinção molar.

As dosagens partiram de diluições do soro em água destilada para um volume final de 0,25 mL, seguida da adição de 0,25 mL do reagente DNS. Essa mistura foi aquecida em banho fervente por cinco minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados mais 2,5 mL de água destilada à mistura, que foi agitada vigorosamente para homogeneização da cor. A leitura foi efetuada a 540 nm. A curva de calibração foi realizada com lactose (Riedel) como padrão.

O reagente DNS foi preparado da seguinte maneira:

- Solução A: 10g de DNS em 200 mL de água destilada. Misturar e agitar sob aquecimento a 37°C, por vinte minutos.
- Solução B: 300g de tartarato de sódio- potássico em 300 mL de hidróxido de sódio  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Misturar e agitar sob aquecimento a 37°C, durante vinte minutos.

A solução A é então adicionada a B suavemente, para evitar a precipitação do ácido, e estocada em frasco âmbar.

### **Determinação do teor de gorduras pelo método de Gerber <sup>38</sup>**

O método mais empregado para a determinação de gordura no leite é o de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na centrifugação e posterior determinação da gordura diretamente em lactobutirômetro.

### 3.1.7 Hidrólise Enzimática do soro do leite

#### *Preparo de soluções*

Ácido ascórbico 20%; Solução de pepsina (5 mg/10 mL de água MilliQ); tripsina (12,5 mg/25 mL de água MilliQ); quimotripsina (12,5 mg/25 mL de água MilliQ); carboxipeptidase (0,625 µL/25 mL de água MilliQ).

#### *Procedimento*

Adicionou-se ácido ascórbico 20% em 10 mL de soro até a solução atingir pH=3. Após acidificação, foi colocado em banho-maria para que o soro permanecesse a 50°C.

Em seguida, 0,666 mL da solução de pepsina foi adicionada ao sistema (o tempo de ação da enzima foi de 20 min.). O pH foi ajustado para 9,5 com hidróxido de amônio para em seguida ser adicionado 0,666 mL da solução de tripsina. Após 10 minutos de ação da tripsina, 0,666 mL de solução de quimotripsina foram adicionadas (tempo de ação 10 min). Para encerrar o processo, 0,666 mL de solução de carboxipeptidase foi acrescentada (tempo de ação de 10 min.). Deixou-se agir por mais 70 minutos, totalizando 120 minutos de hidrólise.

Decidiu-se que os ensaios enzimáticos deveriam ser realizados em pH 9,0 e a temperatura de 50°C, pois num único ensaio seriam adicionadas várias enzimas.

Esta temperatura e pH foram definidos em análises preliminares e adotados para evitar a desnaturação ou diminuição da atividade das enzimas envolvidas favorecendo assim, a hidrólise das proteínas do soro do leite.

### 3.1.8 Determinação de peptídeos pequenos e aminoácidos <sup>39</sup>

Em tubos de centrífuga devidamente identificados com os tempos de retirada das amostras, adicionou-se 0,5 mL de TCA 40% e 0,5 mL de amostra. Agitou-se suavemente e posteriormente submeteu-se à refrigeração por uma noite. No dia posterior, centrifugou-se por 10 minutos em centrífuga analítica Fanem Baby I, na velocidade de 3160 rpm. Retirou-se o sobrenadante e armazenou-se em tubo de microcentrífuga no refrigerador até o momento da análise. Ao hidrolisado foram adicionados os reagentes de Lowry e na sequência fixado o pH próximo de 10 para desenvolvimento da cor. As leituras de absorbância foram realizadas a 700 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando-se tirosina da Riedel-de-Haën como padrão.



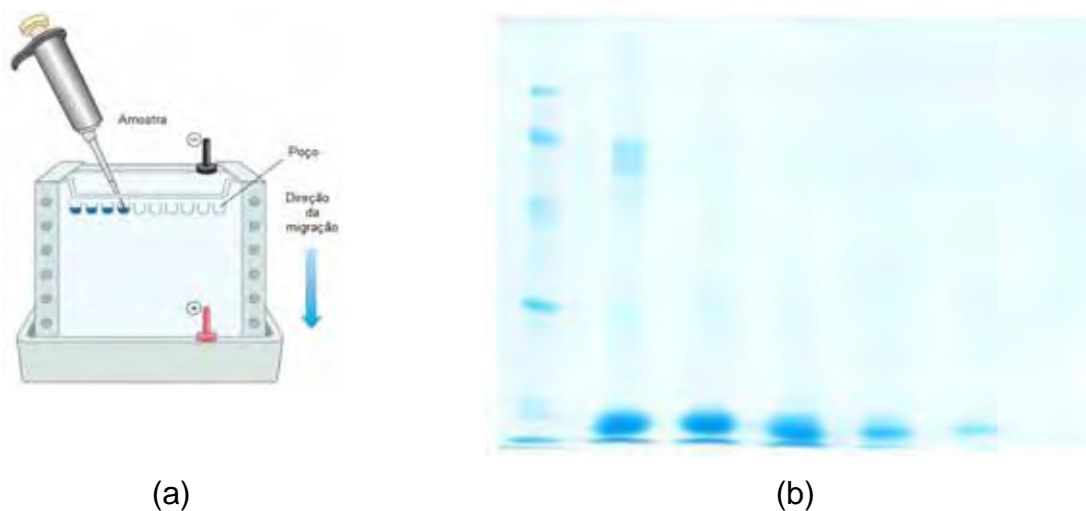
### 3.1.9 Eletroforese (SDS-PAGE) para separação de proteínas <sup>40</sup>

Em porta-amostras (*eppendorfs*) devidamente identificados com os tempos de hidrólise, adicionou-se 150µL de tampão de ruptura e em seguida 150µL de amostra, homogeneizou-se e em seguida congelou-se. O SDS liga-se à maioria das proteínas provavelmente por interação hidrofóbica em quantidades grosseiramente proporcionais ao peso molecular de cada proteína. O detergente adiciona cargas à molécula de proteína, tornando desprezíveis as cargas da mesma. O acompanhamento da separação das proteínas foi realizado por SDS-PAGE em gel 12% e corado com Coomassie Brilliant Blue (ver Figura 6).

Amostras diferentes são colocadas nos poços do gel de poliacrilamida. As proteínas movem-se para o interior do gel quando é aplicado um campo elétrico – ver Figura 6 (a). O gel é retirado e passa por tratamento com azul de Coomassie Brilliant Blue, que se une as proteínas– ver Figura 6 (b). Os pequenos e médios peptídeos migram para extremidade inferior do gel

A massa molecular aparente foi determinada utilizando-se um kit Amersham Biosciences composto por fosforilase b (97 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e  $\alpha$  – lactoalbumina (14,4 kDa).

**Figura 6.** Eletroforese. (a) amostras do soro em diferentes tempos de hidrólise são carregadas nos poços do PAGE. As proteínas movem-se para o interior do gel quando é aplicado um campo elétrico; (b) As proteínas podem ser visualizadas após a eletroforese por tratamento do gel com Comassie Brilliant Blue. Peptídeos pequenos migram para a extremidade inferior do gel.



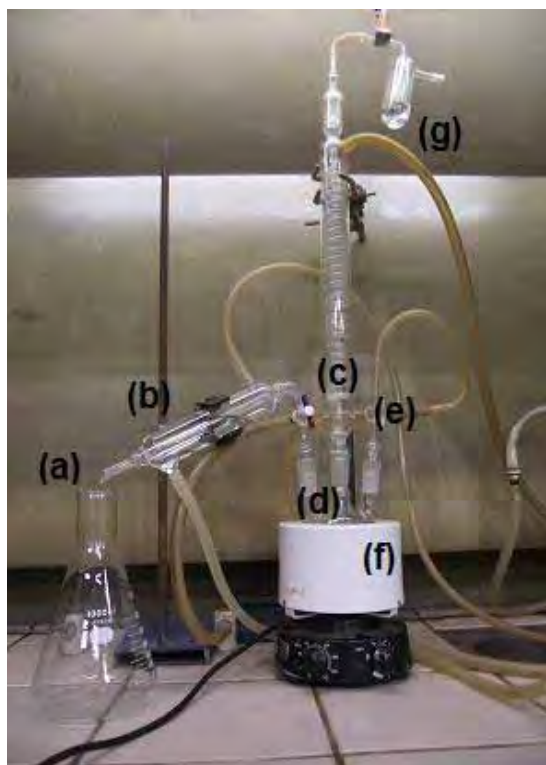
### 3.1.10 Hidrólise Enzimática – Uma nova tentativa

Em virtude dos resultados inicialmente obtidos, foi realizada uma nova tentativa de hidrólise enzimática (**NTH**), porém em condições diferentes da proposta inicial. Para isso, selecionamos uma amostra de soro dialisado e sem gordura. Diluiu-se 5 mL de soro em 95 mL de H<sub>2</sub>O de Milli Q, ajustou-se o pH para 2,0 com solução de ácido clorídrico 6 mol·L<sup>-1</sup> e, em seguida, adicionou-se 0,48 mg de pepsina dissolvida em 3 mL de HCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. Submeteu-se, então, o sistema a aquecimento em banho-maria para que o soro permanecesse a 37°C. O mesmo foi mantido sob agitação constante por 2 horas. Resfriou-se o sistema e elevou-se o pH com NaHCO<sub>3</sub> 0,5 mol·L<sup>-1</sup>, até 7,5. Em seguida, 0,1 g de pancreatina e 0,625 g de extrato biliar foram adicionados a 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol·L<sup>-1</sup> e posteriormente reunidos ao material diluído. Submeteu-se o sistema, novamente, a banho-maria para que o soro permanecesse a 37 °C, temperatura ótima para atuação da pancreatina e do extrato biliar, segundo análises prévias realizadas. Manteve-se o mesmo sob agitação constante durante 2 horas. Para finalizar, o mesmo foi fervido para inativar as enzimas presentes.

### 3.1.11 Hidrólise ácida do soro do leite

Fountoulakis & Lahm, em um artigo de revisão sobre hidrólise e análise de composição de proteínas, propõem uma metodologia para a realização de hidrólise ácida <sup>41</sup>. Considerando tais condições, propusemos uma metodologia que reúne algumas semelhanças. Foram pesados em balança analítica 520,0 mg de soro previamente hidrolisado enzimaticamente, em seguida foram tomados 104 mL de ácido clorídrico 6 mol·L<sup>-1</sup> (proporção 5 mg: 1 mL). Ambos foram colocados num frasco de três bocas (capacidade de 250 mL) para permitir o refluxo do material a ser hidrolisado e a entrada de nitrogênio para assegurar atmosfera inerte, evitando assim possível oxidação do material e saída de ácido clorídrico pelo condensador que foi aberto após 72 horas. A Figura 7 apresenta os componentes do sistema utilizado.

**Figura 7.** Hidrólise ácida. (a) erlenmeyer para recolhimento de HCl; (b) e (c) condensadores para liberação de ácido e refluxo do material submetido à hidrólise ácida, respectivamente; (d) balão de três bocas; (e) entrada de N<sub>2</sub>; (f) manta térmica e agitador magnético; (g) escape de N<sub>2</sub>.



O sistema foi aquecido durante 72 horas na temperatura de 110°C, sendo retiradas alíquotas de 1 mL de 12 em 12 horas. As amostras foram analisadas por cromatografia de troca iônica.

### 3.1.12 Liofilização do soro hidrolisado do leite bovino

Os primeiros resultados deste trabalho apontaram para a conveniência da obtenção do material hidrolisado no estado sólido, antes da realização das sínteses dos compostos metálicos. Portanto, naquela ocasião, adaptou-se um método descrito na literatura <sup>42</sup>, para que houvesse a precipitação do hidrolisado presente no soro do leite bovino, conforme Figura 8.

**Figura 8.** Fluxograma ilustrativo do procedimento de precipitação do hidrolisado a partir de hidrolisado de soro de leite bovino.



Em etapa posterior do trabalho, optou-se por obter a mistura sólida de hidrolisado a partir da liofilização do soro hidrolisado do leite bovino, tal amostra foi

denominada **AA2** (Figura 9). Para esse fim, foi utilizado o Liofilizador L101 da marca Liotop, a uma temperatura de -30°C.

**Figura 9.** Material liofilizado



## 3.2 COMPOSTOS DE COBRE CONTENDO HIDROLISADO DE SORO DE LEITE

### 3.2.1 Sínteses

#### 3.2.1.1 Rota Sintética A

Em um béquer de aproximadamente 100 mL, solubilizou-se 0,2046 g de soro hidrolisado enzimaticamente e liofilizado (**AA2**) em 30 mL de etanol com auxílio do ultrassom. Para efeitos de cálculo da razão molar metal:ligante, consideramos tal massa correspondente a 1,54 mmol de hidrolisado. Isso leva em consideração as proporções dos componentes do soro segundo dados da literatura<sup>30</sup> e baseia-se na média ponderada em relação às massas dos aminoácidos presentes no soro hidrolisado (Tabela 4) e as massas molares de cada um desses ligantes presentes no meio reacional:

$$\text{Massa Molar Média} = \frac{\sum (\text{massa molar aminoácido} \times \text{massa do aminoácido no soro})}{\text{massa total dos aminoácidos no soro hidrolisado}}$$

O valor encontrado é de 132,90 g·mol<sup>-1</sup>. Como a quantidade de matéria do precursor de cobre foi igual a 0,695 mmol (ver a seguir) tem-se nesse caso, para essa rota a proporção 1 metal : 2,2 ligante.

Ajustou-se o pH para 9,6 através da adição de hidróxido de amônio concentrado. Manteve-se a solução sob agitação e aquecimento (próximo de 50 °C)

e adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,695 mmol (0,1734 g) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Após a adição das primeiras gotas da solução salina, observou-se a mudança de cor da solução para azul, seguida da formação de um sólido azul escuro. A mistura permaneceu sob agitação por 1 hora, finda a qual, realizou-se uma filtração a vácuo, que separou o sólido azul obtido e a solução. A etapa seguinte consistiu em várias lavagens do sólido obtido com etanol frio. O precipitado da síntese resultou em uma massa de 0,1910 g e foi rotulado como amostra **CuSAA2**.

### 3.2.1.2 Rota Sintética B

Em um béquer de aproximadamente 100 mL, solubilizou-se 64,92 mmol (8,6279 g) de **AA2** em 20 mL de água com auxílio do ultrassom (sendo considerada a média ponderada dos ligantes). Ajustou-se o pH para 12,0 através da adição de hidróxido de sódio e transferiu-se para um frasco Schlenk. Em seguida, sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , adicionou-se lentamente solução aquosa salina contendo 29,32 mmol (7,0849 g) de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Observou-se a mudança de cor da solução para verde, seguida da formação de sólido amarelo que foi rotulado como amostra **CuNAA2**. O tempo total de síntese foi de 30 minutos, após a qual, realizou-se uma filtração sob atmosfera inerte (Figura 10 a) para separar o sólido amarelo obtido da solução de cor verde. Na etapa seguinte, foram efetuadas lavagens consecutivas com etanol, água e acetona gelados e desaerados. Por ser bastante instável ao oxigênio atmosférico, o sólido foi armazenado em ampola de vidro selada a vácuo (Figura 10 b). Para esta rota a razão metal ligante foi igual a 1metal: 2,2 ligante.

**Figura 10.** (a) Filtração em atmosfera de nitrogênio; (b) composto selado a vácuo em ampola de vidro.



(a)



(b)

### 3.2.1.3 Rota Sintética C – método de difusão

Em um béquer de 100 mL, foram solubilizados 0,5 mmol (0,1248 g) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 10 mL de DMF. Em seguida, sobre a superfície da solução foram gotejados 4 mL de metanol. A etapa final consistiu em adicionar, gota a gota, uma suspensão constituída de 15 mL de metanol, 5 mL de água, 1,1 mmol de **AA2** (cálculo referente a média ponderada), 1,2 mmol de NaOH (0,0480g) e pH= 9,2. O sistema foi deixado em geladeira por 15 dias. Durante esse período observou-se a formação de sólido de coloração verde-água. Este foi filtrado e submetido a diversas lavagens com etanol e água frios. Em seguida, foi rotulado como **CuSDAA2**. Para esta rota a razão metal ligante foi igual a 1metal: 2,2 ligante.

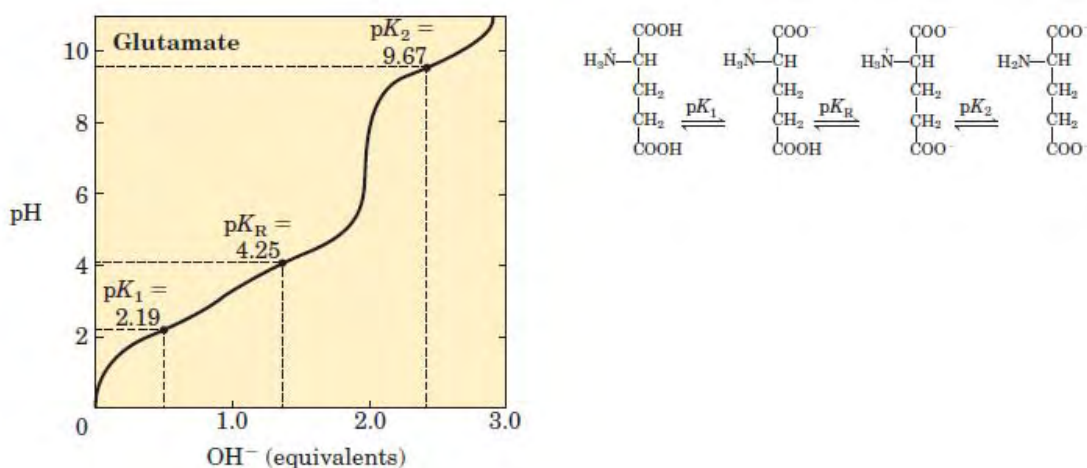
### 3.2.2 Condições reacionais

Para calcular a massa de metal necessária para reagir com o hidrolisado sólido **AA2** considerou-se estequiometria 1M: 2,2L (**Rotas A, B e C**).

Levando-se em conta que o ácido glutâmico é o principal aminoácido presente no soro do leite estabelecemos o pH do meio reacional em valores superiores a 9,67 para as **Rotas A e B**. Este aminoácido é doador de três íons  $\text{H}^+$  em  $\text{pH} > 9,67$  conforme ilustra sua curva de titulação mostrada na Figura 11. Isso é

devido à presença de dois grupos carboxílicos que contribuem para a diminuição da carga líquida da espécie em razão do aumento dos valores de seus  $pK_a$  e do grupo  $\alpha$ -amino protonado <sup>43</sup>. Esta característica do glutamato assegura sua potencialidade de coordenação ao centro metálico como foi proposto em nossa rota sintética.

**Figura 11.** Curva de titulação do ácido glutâmico ( $pK_R = pK_a$  do grupo R) <sup>24</sup>.



### 3.2.3 Estudo dos compostos de cobre

#### 3.2.3.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Nicolet Impact 400 ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , usando pastilhas de KBr.

#### 3.2.3.2 Complexometria com EDTA <sup>44</sup> para análise do teor de cobre nos compostos

Para a análise do teor de cobre foram pesados 10mg da amostra, em uma balança com incerteza de 0,01 mg. A amostra foi aberta pela adição de cinco gotas de solução aquosa de  $HNO_3$  (70 % m/m) a quente. Após resfriamento, adicionou-se 1 mL 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 submetida à titulação 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:

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

Onde:  $T_{\text{metal}}$  = porcentagem de metal no composto/  $M_{\text{metal}}$  = massa molar do metal/  $C_{\text{EDTA}}$  = concentração do EDTA utilizado/  $V_{\text{EDTA}}$  = volume de EDTA utilizado/  $C_{\text{ZnCl}_2}$  = concentração do cloreto de zinco utilizado/  $V_{\text{ZnCl}_2}$  = volume de cloreto de zinco gasto na titulação/  $m_{\text{composto}}$  = massa medida do composto.

### 3.2.3.3 Voltametria Cíclica

As voltametrias cíclicas foram obtidas no Potenciostato - AUTOLAB Type III utilizando eletrodos de pasta de carbono. O potencial foi varrido de -1000 a 1000 mV, no qual foi utilizado uma solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,0) e velocidade de varredura  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . A pasta de carbono foi preparada misturando 45 mg de pó de grafite, 5 mg do complexo e 0,5 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula e a seguir deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de agente aglutinante, óleo mineral para a formação da pasta de carbono. A seguir, a pasta de carbono preparada foi colocada na cavidade de um eletrodo composto por um tubo de vidro e um fio de platina incorporado nele que está em contato com um disco de platina de 4 mm de diâmetro e colocado à profundidade de 1 mm de uma das extremidades do tubo, deixando uma cavidade própria para a incorporação da pasta no eletrodo (ver Figura 12). Finalmente a superfície foi uniformizada com papel sulfite limpo, antes da realização das medidas.

**Figura 12.** Aspecto do eletrodo de trabalho adequado para uso de pasta de carbono.



#### **3.2.3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no microscópio de alta resolução TOPCON SM-300 operando entre 10 e 20 kV. As amostras foram colocadas em suporte, cobertas com uma fina camada de ouro.

#### **3.2.3.5 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Ana Maria Ferreira do Instituto de Química da USP de São Paulo. Os espectros de EPR foram obtidos no espectrômetro BRUKER, modelo EMX, operando na banda X (9,33 GHz), com potência de 20 mW e frequência de modulação de 100 kHz. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, utilizando as amostras no estado sólido.

#### **3.2.3.6 Espectroscopia de luminescência (EL)**

Átomos no estado excitado podem retornar aos níveis iniciais através de transições radiativas (emissão espontânea) ou não-radiativas (perda por energia vibracional). O monitoramento das transições radiativas em um material pela incidência de uma radiação eletromagnética resume a técnica de Espectroscopia de Fotoluminescência.

Os espectros de excitação permitem obter a informação sobre o  $\lambda$  de excitação que efetivamente contribui para um determinado  $\lambda$  de emissão observado. O espectro de emissão permite obter informação de qual parte do espectro de absorção contribui para a observação de uma determinada emissão.

Os experimentos de fotoluminescência foram realizados no espectrofluorímetro Jobin-Yvon Modelo SPEX Fluorolog FL3-22, equipado com lâmpada de xenônio de 450W. Todos os espectros foram obtidos a temperatura ambiente.

### **3.2.3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A CLAE é uma técnica cromatográfica que tem um líquido como fase móvel e fases estacionárias que podem ser líquidas ou sólidas, sendo estas mais comumente utilizadas. Emprega alta pressão na separação dos componentes da amostra e por isso, é capaz de completar a análise em alguns minutos além de promover adsorção de líquidos em partículas extremamente pequenas e uniformes para promover alta sensibilidade. O equipamento utilizado na CLAE é caro e sofisticado, pois é resultado da aplicação de alta pressão, necessária para operar colunas extremamente eficientes, recheadas com partículas de diâmetro muito pequeno, a uma velocidade de fluxo de poucos mL/min.

## **3.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS DE COBRE**

Em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Célia Bertolini e Dra. Eliane C. Freitas, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, foram realizados ensaios de resistência a complexos de cobre em *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. da linhagem FB-04 selvagem, fornecida como linhagem resistente a cobre, isolada de Corrientes, Argentina, e gentilmente cedida pelo Dr. Franklin Behlau (FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP).

### **3.3.1 Metodologia utilizada** <sup>33</sup>

Para a avaliação de resistência a cobre, o isolado de *Xcc* foi rejuvenescido em meio TSA sólido, pré-inoculado em meio Agar Nutriente tamponado (extrato de carne 0,2%, peptona 0,5% e NaCl 0,5%, pH 6,8) e um volume do pré-inóculo correspondente à densidade óptica de 0,5 a 550 nm foi transferido para novo meio Agar Nutriente tamponado, agora na ausência ou presença de complexos de Cu. A avaliação do crescimento celular (28°C e 200 rpm) foi realizada por análises de turbidimetria, em triplicata, a 550 nm após 24 horas.

### **3.3.2 Condições de estocagem** <sup>33</sup>

As células foram estocadas em meio TSA (triptona 1%, sacarose 1% e glutamato de sódio 0,1%) contendo 16% de glicerol a -80°C.

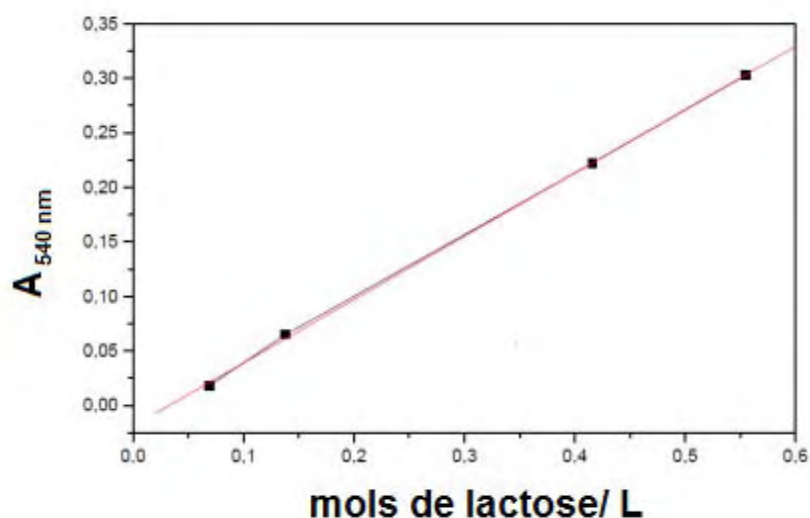
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SORO DO LEITE BOVINO

#### 4.1.1 Dosagem de açúcar redutor no soro do leite hidrolisado via processo enzimático <sup>45</sup>

Para a dosagem de açúcar redutor, utilizou-se o método de Miller <sup>37</sup>. A curva de calibração utilizada, para posterior determinação da concentração de açúcar redutor no soro do leite, foi de lactose como apresentada na Figura 13. O coeficiente de extinção molar para a lactose, a partir da curva, apresentou valor igual a  $290 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

**Figura 13.** Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.



A lei de Lambert-Beer é o fundamento da espectrofotometria, 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 ótico).

Tal lei pode ser expressa matematicamente pela relação:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Onde:  $A$  = absorvância real;  $\varepsilon$  = absorbtividade molar ou coeficiente de extinção molar (capacidade que um mol de substância tem em absorver luz a um dado comprimento de onda);  $l$  = distância percorrida pela luz através da substância;  $c$  = concentração da espécie.

Sendo assim, podemos inferir a partir da observação da Figura 13, que a reta foi 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, a Lei de Lambert Beer; além disso, a porção linear englobou a maioria dos pontos, o que garante um bom limite de sensibilidade do método.

A **Tabela 6** apresenta os valores obtidos nas dosagens.

**Tabela 6.** Quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.

<b>Amostras de soro</b>	<b>mol·L<sup>-1</sup></b>
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)	$8,0 \cdot 10^{-4}$

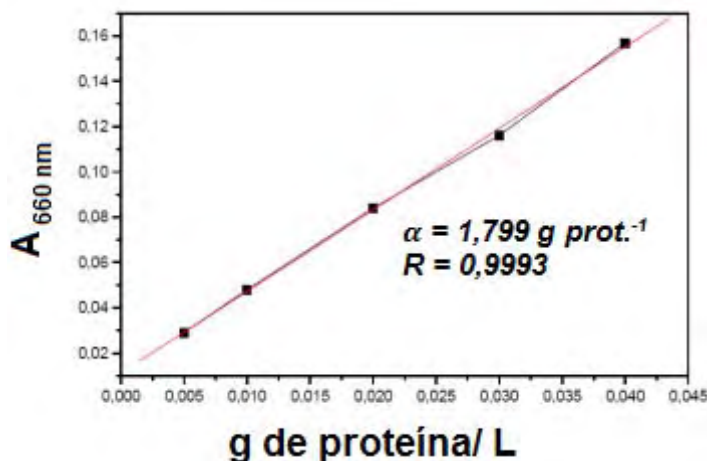
Cabe ressaltar que os valores de concentração do açúcar redutor para o soro de leite puro produzido no laboratório podem apresentar diferenças devido a fatores como tipo de leite utilizado, raça do animal, estágio de lactação ou tipo de tratamento sofrido pelo leite. Ainda de acordo com a Tabela 6 pode-se 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.

#### **4.1.2 Dosagem de proteína <sup>45</sup>**

O método de dosagem de proteínas utilizado neste trabalho, para estimar o conteúdo protéico do soro do leite produzido em laboratório nas várias etapas de processamento (soro puro, soro dialisado e soro dialisado e filtrado), foi o método de Lowry modificado por Hartree <sup>36</sup>. A Figura 14 mostra a curva de calibração de 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 14.** Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.



A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos com as dosagens de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

**Tabela 7.** Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

Amostras de soro	g·L <sup>-1</sup>
Soro produzido em laboratório (sem tratamento)	14,71
Soro produzido em laboratório (dialisado)	6,99
Soro produzido em laboratório (dialisado e filtrado)	6,18
Soro industrial	6,15

A partir da Tabela 7 notam-se diferenças existentes entre as dosagens de proteínas que ocorreram no soro puro e nos soros dialisado, dialisado e filtrado. A lactose presente no soro do leite interfere na análise pelo método de Lowry. Sendo um açúcar redutor, reduz o cobre presente na solução de dosagem de proteína provocando com isto, um aumento na coloração e conseqüentemente nos valores superestimados de proteína.

A quantidade do açúcar redutor foi diminuída após a realização dos tratamentos de diálise e filtração do soro, 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 também poderiam causar alterações no resultado da dosagem de proteínas.

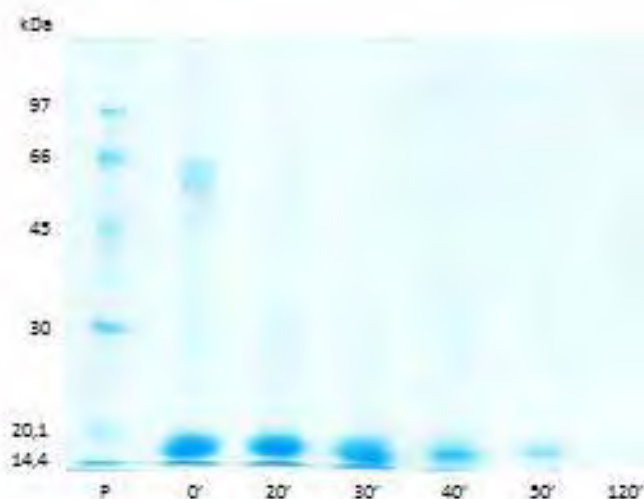
De acordo com o resultado da dosagem de proteínas obtido para o soro tratado, pode-se constatar que os métodos de tratamento foram eficientes, pois, os valores determinados nas dosagens do soro produzido são coincidentes aos valores da literatura <sup>34, 46</sup>.

Ressalta-se que, foi obtida uma reta entre os limites de concentração de cada uma das soluções utilizadas, tal reta representa uma relação de proporcionalidade entre as absorvâncias e as concentrações das mesmas, obedecendo assim, a Lei de Lambert Beer; além disso, a porção linear englobou a maioria dos pontos, o que garante um bom limite de sensibilidade do método.

#### 4.1.3 Eletroforese do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato <sup>34</sup>

Os resultados obtidos com as eletroforeses (Figura 15) 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 15.** 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 de 12%) 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 detergente SDS e em seguida transferidas uma a uma para os diversos poços de gel (ver Figura 6 (a)).

O detergente mencionado tem a capacidade de ligar-se às proteínas por meio de interações hidrofóbicas e contribuir com uma grande carga negativa, que resulta numa insignificância de carga dos polipeptídeos. Isto assegura uma razão semelhante entre carga e massa. Concomitantemente, o SDS é capaz de alterar a conformação nativa das proteínas fazendo que a maioria delas adquira formas semelhantes <sup>43</sup>.

A eletroforese empregada foi capaz de separar os polipeptídeos quase que exclusivamente com base em seu peso molecular, com as menores migrando mais rapidamente. Após o processo, o azul de Coomassie adicionado interage com as proteínas favorecendo a monitoração, já que um grande número de bandas visualizadas no gel diminuem ao longo do tempo. A hidrólise do soro por via enzimática fica assim evidenciada. Cabe ressaltar que o corante é específico para proteínas, sendo assim esta técnica não é sensível para aminoácidos.

Podemos observar que no tempo 120 minutos ocorrem desaparecimento de bandas devido o fato do corante (azul de Coomassie) ligar-se apenas às proteínas de alto peso molecular que com o passar do tempo são hidrolisadas pelas enzimas utilizadas.

A interação entre 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 absorvância é proporcional à quantidade de corante ligado e conseqüentemente a concentração dos maiores peptídeos da amostra <sup>47</sup>.

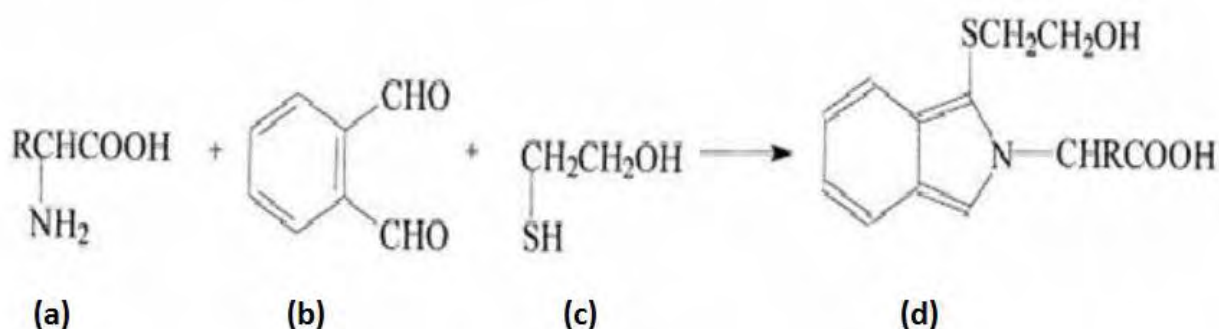
#### 4.1.4 Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método de derivatização pós-coluna com OPA 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 350nm e comprimento de emissão igual a 450nm.

A derivatização é um procedimento químico onde os grupos carboxílicos e aminos pertencentes aos aminoácidos (Figura 16 a) reagem com OPA (Figura 16 b) para formar isoindoles (Figura 16 d) altamente fluorescentes e estáveis <sup>48</sup>.

Em geral, juntamente com OPA são utilizadas substâncias que possuem em sua estrutura o componente sulfidril como, por exemplo, o 2-ME (Figura 16 c), o 3-MPA ou sulfito de sódio, os quais favorecem a formação de adutos hidrofóbicos do OPA com aminoácidos primários <sup>49</sup>.

**Figura 16.** Exemplo de reação de derivatização.



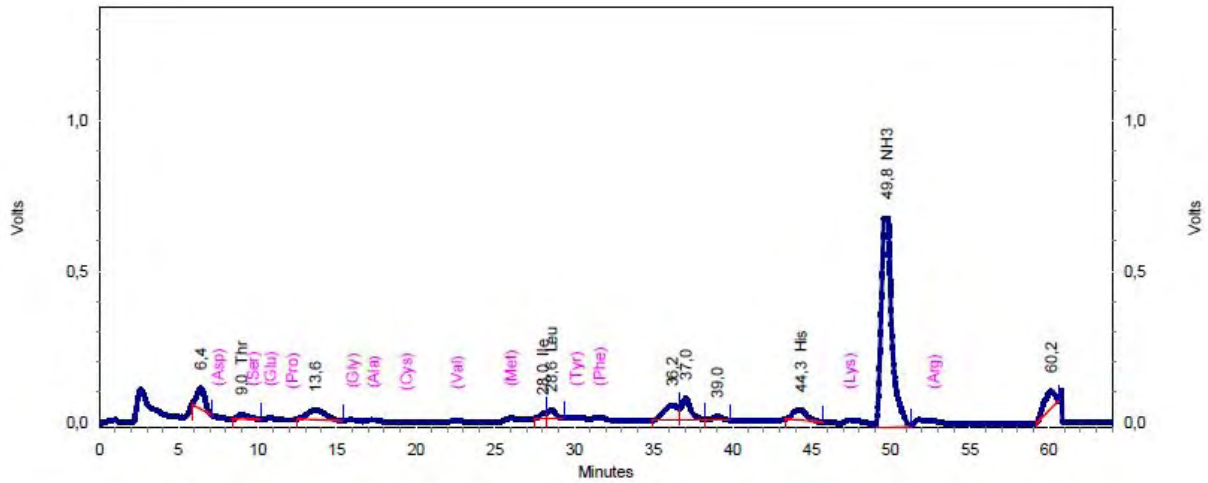
Após a formação de derivados, a separação dos aminoácidos ocorre através de uma coluna de fase reversa.

#### 4.1.5 Hidrólise Enzimática

Apesar da expectativa da possível hidrólise total do soro, pudemos observar que o método enzimático não gerou os aminoácidos em quantidades significativas. Tal resultado é relatado na Figura 17, onde observamos valores não satisfatórios para áreas dos picos correspondentes às concentrações dos aminoácidos

resultantes da hidrólise enzimática. O padrão a ser considerado é apresentado na Figura 18.

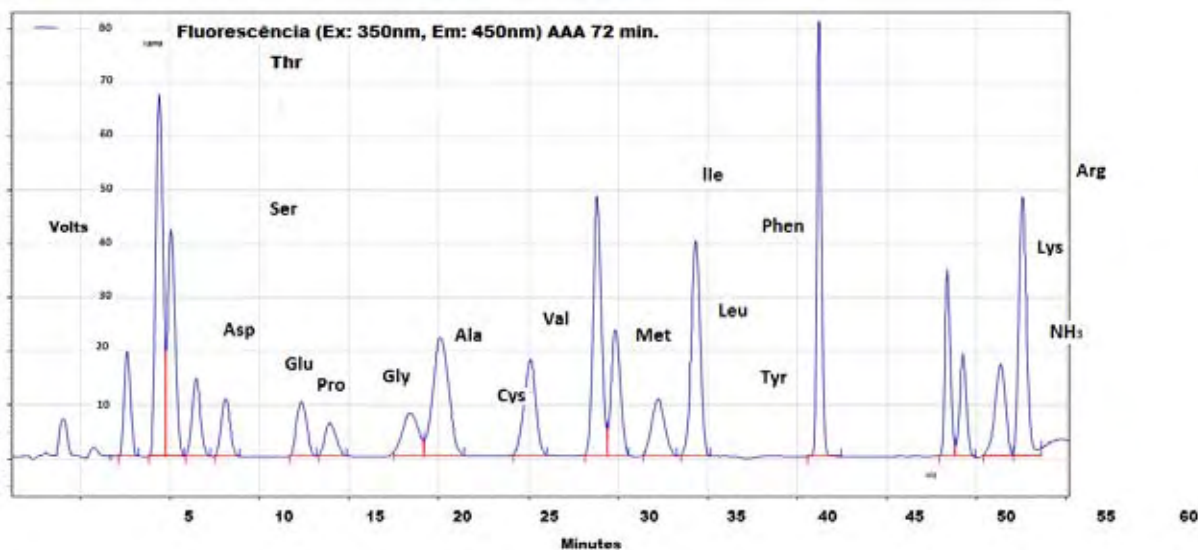
**Figura 17.** Aminograma obtido em CLAE para o soro hidrolisado enzimaticamente.



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 18.** Aminograma padrão (mistura de 16 aminoácidos) obtido em CLAE.



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	

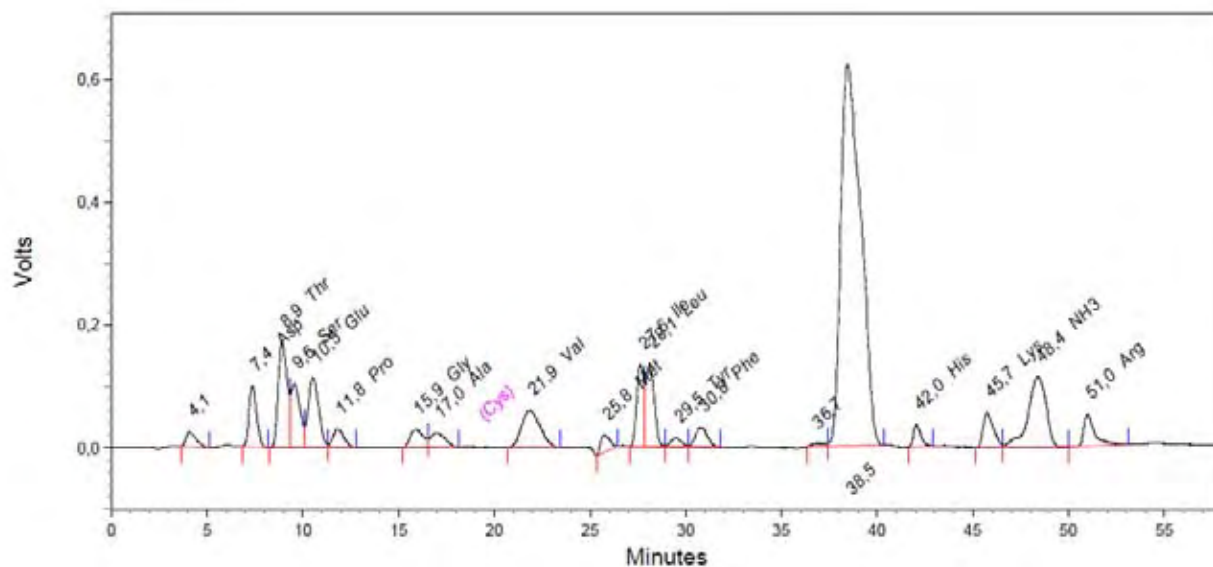
Contudo, sabemos que houve hidrólise do soro, pois os resultados das eletroforeses nos indicaram tal fenômeno, mas a conclusão é a de que pequenos e médios peptídeos permaneceram intactos no meio reacional.

#### 4.1.6 Uma nova tentativa de hidrólise (NTH)

A NTH também não se mostrou eficiente. Apesar do uso de novas enzimas como a pancreatina, do extrato biliar e das alterações de pH no meio reacional, o resultado da análise de aminoácidos realizada por cromatografia de troca iônica (Figura 19) revelou que os aminoácidos desejados para a síntese de compostos não

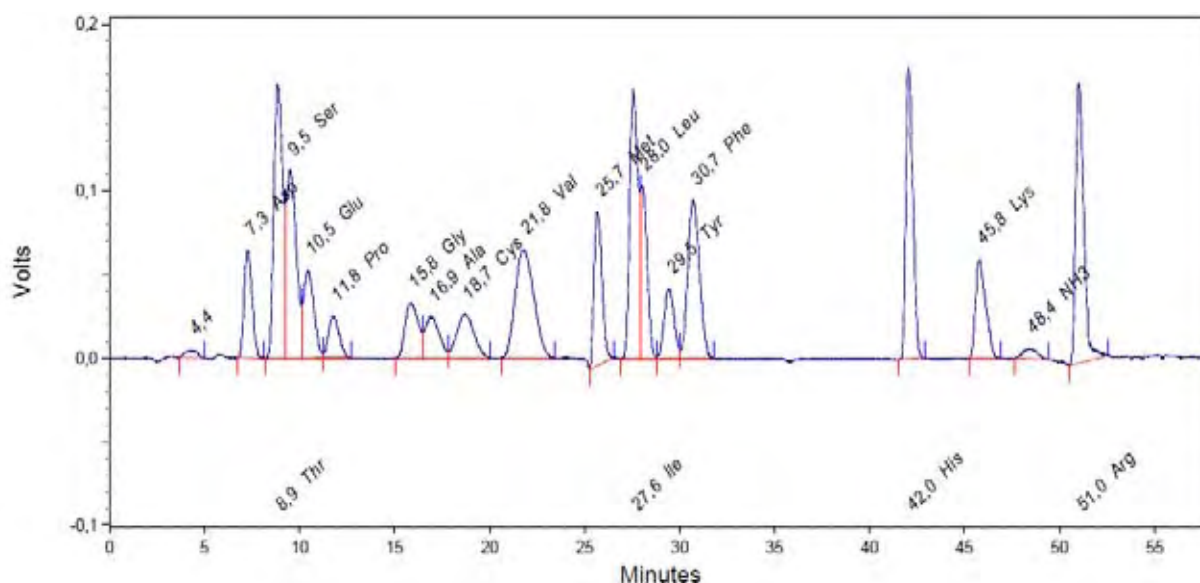
foram liberados em proporções satisfatórias. Na Figura 20 é apresentado o padrão desta análise.

**Figura 19.** Aminograma obtido em CLAE para amostra NTH.



Fluorescência (Ex:350nm, Em:450nm)						
PK #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor	
1		4.106	901710	0,000	0,00	
2	Asp	7.363	2775025	119,216	23277,38	
3	Thr	8.916	5652818	96,703	58455,27	
4	Ser	9.553	3444110	68,956	49946,17	
5	Glu	10.530	4376364	163,667	26739,48	
6	Pro	11.831	1184354	86,709	13658,92	
7	Gly	15.897	1388960	49,395	28119,20	
8	Ala	16.997	1231185	58,154	21171,19	
9	Val	21.850	4026633	78,281	51438,17	
10	Met	25.751	942855	26,402	35710,88	
11	Ile	27.628	3545589	63,871	55511,84	
12	Leu	28.114	4055080	129,047	31423,26	
13	Tyr	29.509	561565	28,410	19766,68	
14	Phe	30.786	1367769	29,656	46121,30	
15		36.725	254687	0,000	0,00	
16		38.457	44910480	0,000	0,00	
17	His	42.043	927920	18,522	50098,77	
18	Lys	45.724	2079672	109,406	19008,84	
19	NH3	48.392	7493131	1736,534	4314,99	
20	Arg	50.988	2043873	39,358	51930,66	
Totals			93163783	2902,287		

**Figura 20.** Aminograma padrão obtido em CLAE.



Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

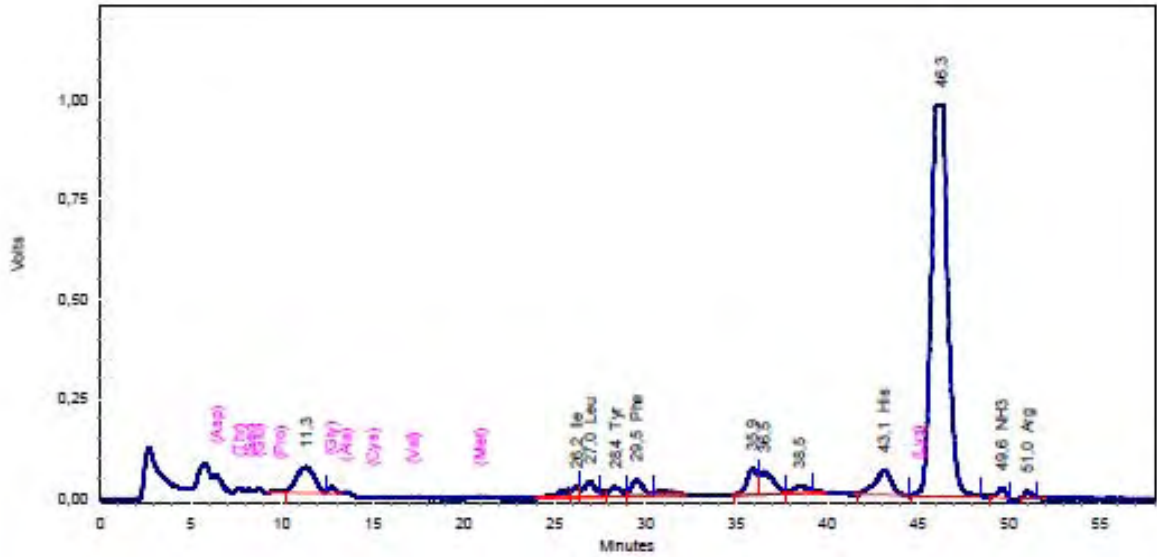
Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		4.363	196937	0,000	0,00
2	Asp	7,276	1874936	80,548	23277,38
3	Thr	8,865	5456670	93,348	58455,27
4	Ser	9,515	4047160	81,030	49946,17
5	Glu	10,452	2002623	74,894	26739,48
6	Pro	11,783	990302	72,502	13658,92
7	Gly	15,844	1607800	57,178	28119,20
8	Ala	16,934	1284682	60,681	21171,19
9	Cys	18,691	1649455	89,155	18501,07
10	Val	21,770	4410989	85,753	51438,17
11	Met	25,680	2696701	75,515	35710,88
12	Ile	27,572	4878843	87,888	55511,84
13	Leu	28,038	2557231	81,380	31423,26
14	Tyr	29,451	1558433	78,841	19766,68
15	Phe	30,714	4048522	87,780	46121,30
16	His	42,050	4585671	91,533	50098,77
17	Lys	45,761	2210764	116,302	19008,84
18	NH3	48,366	330626	76,623	4314,99
19	Arg	51,014	5026044	96,784	51930,66
Totals			51414390	1487,734	

#### 4.1.7 Metodologia para obtenção de aminoácidos via hidrólise ácida

Uma alternativa no processo de obtenção de aminoácidos foi utilizarmos um sistema contendo refluxo, condensador, atmosfera inerte e como reagente ácido clorídrico  $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sua viabilidade pode ser evidenciada pela análise dos

aminogramas apresentados nas Figuras 21-24. O padrão para essas análises foi apresentado na **Figura 20**.

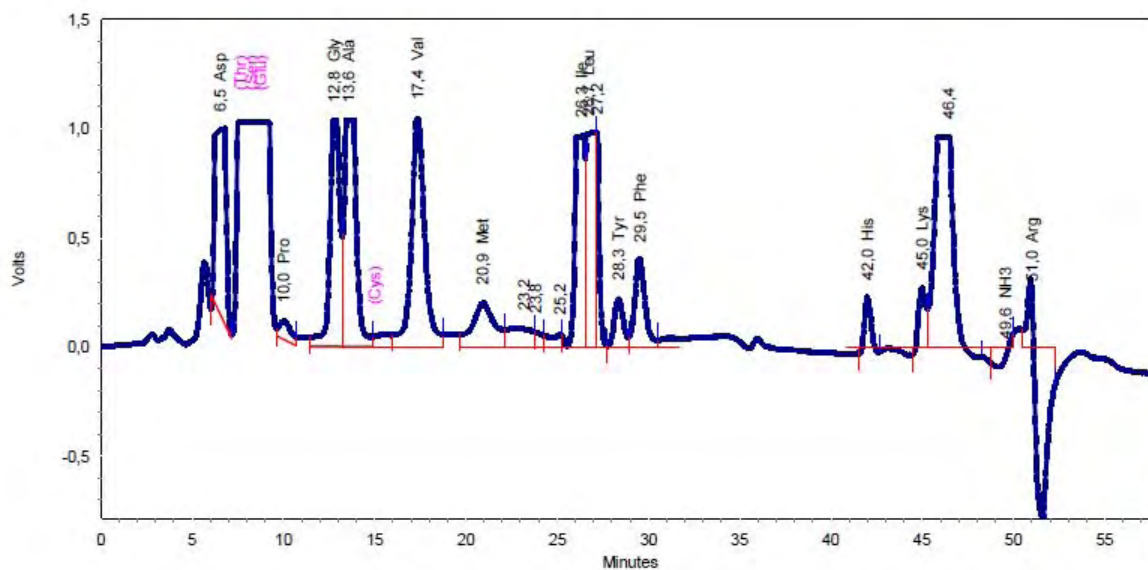
**Figura 21.** Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em  $t = 0$ .



Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1		11,324	4464473	0,000	0,00
2	Ile	26,214	705377	8,769	80441,10
3	Leu	26,954	1552574	29,612	52431,19
4	Tyr	28,359	1046001	21,260	49201,09
5	Phe	29,522	1787457	27,894	64081,16
6		35,885	2623335	0,000	0,00
7		36,517	2911755	0,000	0,00
8		38,452	1125018	0,000	0,00
9	His	43,119	3904121	56,040	69666,16
10		46,290	61862761	0,000	0,00
11	NH3	49,588	702328	53,856	13040,87
12	Arg	50,982	532235	5,124	103869,75
13		60,148	536340	0,000	0,00
14		60,870	612269	0,000	0,00
Totals			84366045	202,554	

Figura 22. Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em t = 12 horas.



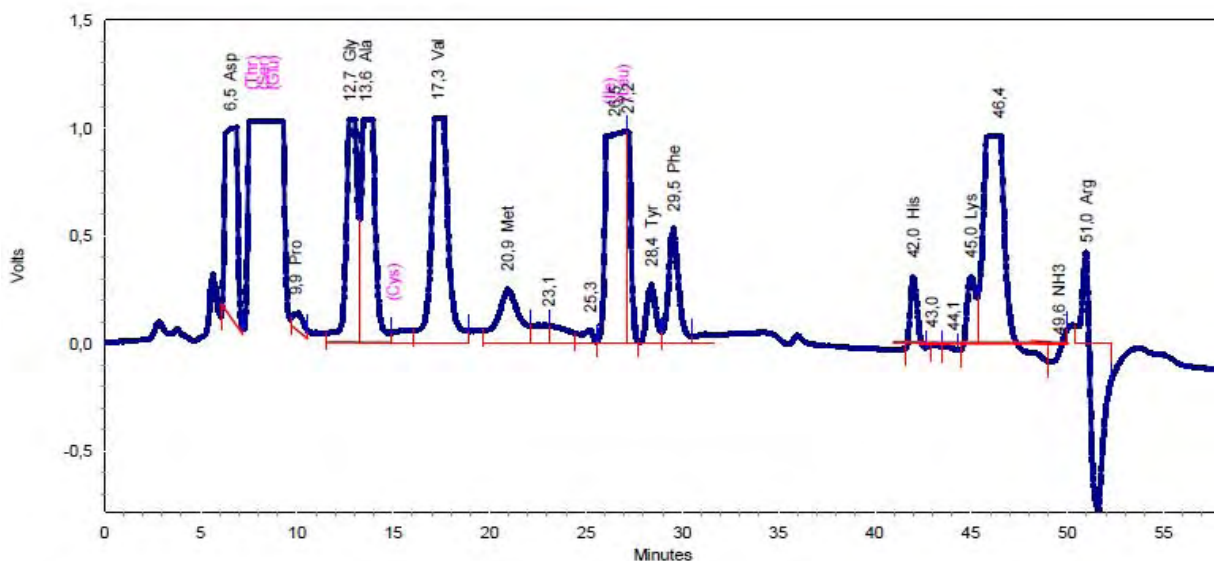
Fluorescência  
(Ex: 350nm, Em: 450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,525	36864815	250,700	147047,52
2	Pro	9,990	1603695	142,608	11245,51
3	Gly	12,766	35411387	275,085	128729,02
4	Ala	13,564	43929798	693,370	63356,98
5	Val	17,357	45015685	563,170	79932,67
6	Met	20,919	8413861	139,476	60324,73
7		23,180	2863393	0,000	0,00
8		23,800	736549	0,000	0,00
9		25,157	1742930	0,000	0,00
10	Ile	26,339	36307286	451,352	80441,10
11	Leu	26,716	34805422	663,831	52431,19
12		27,167	10969437	0,000	0,00
13	Tyr	28,350	7649274	155,470	49201,09
14	Phe	29,535	13691362	213,657	64081,16
15	His	41,989	6900188	99,046	69666,16
16	Lys	44,978	9068757	622,058	14578,63
17		46,436	72208705	0,000	0,00
18	NH3	49,580	955598	73,277	13040,87
19	Arg	51,026	12214260	117,592	103869,75
20		60,144	1278548	0,000	0,00

Totals			382630950	4460,691	
--------	--	--	-----------	----------	--



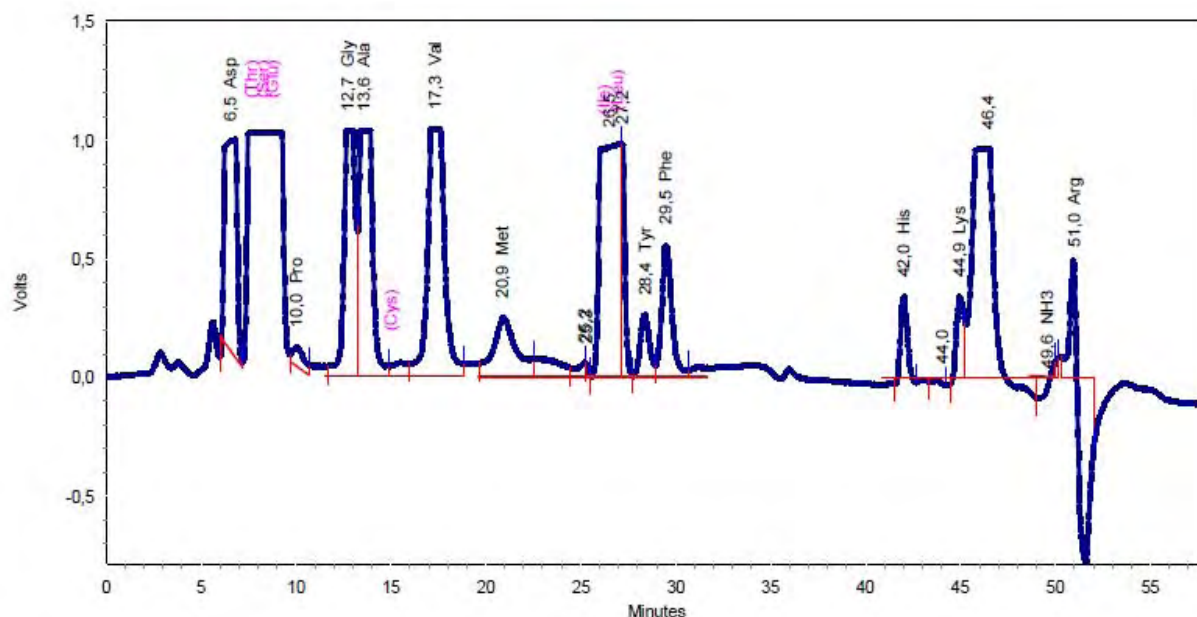
**Figura 23.** Aminograma obtido em CLAE em alíquota retirada em t = 24 horas.



Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,525	39292040	267,206	147047,52
2	Pro	9,923	1389398	123,551	11245,51
3	Gly	12,733	37602349	292,105	128729,02
4	Ala	13,564	48509229	765,649	63356,98
5	Val	17,320	55601757	695,607	79932,67
6	Met	20,945	10591405	175,573	60324,73
7		23,075	1600134	0,000	0,00
8		25,262	2214509	0,000	0,00
9		26,472	69878906	0,000	0,00
10		27,167	14241778	0,000	0,00
11	Tyr	28,401	8857358	180,024	49201,09
12	Phe	29,547	17346483	270,696	64081,16
13	His	41,993	8843496	126,941	69666,16
14		42,973	609179	0,000	0,00
15		44,081	1019552	0,000	0,00
16	Lys	44,983	11062423	758,811	14578,63
17		46,436	76517513	0,000	0,00
18	NH3	49,565	780453	59,847	13040,87
19	Arg	50,996	15723098	151,373	103869,75
20		60,144	1707168	0,000	0,00
21		60,300	605308	0,000	0,00
22		60,826	548941	0,000	0,00
Totals			424542478	3867,383	

**Figura 24.** Aminograma obtido em CLAE para alíquota retirada em t = 36 horas.



Fluorescência (Ex:350nm, Em:450nm)					
PK #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,525	40606929	276,148	147047,52
2	Pro	9,990	1411930	125,555	11245,51
3	Gly	12,706	40576357	315,208	128729,02
4	Ala	13,564	46765734	738,131	63356,98
5	Val	17,320	57728532	722,214	79932,67
6	Met	20,854	11186456	185,437	60324,73
7		25,183	1156606	0,000	0,00
8		25,275	673813	0,000	0,00
9		26,472	72434703	0,000	0,00
10		27,167	12666079	0,000	0,00
11	Tyr	28,376	8977667	182,469	49201,09
12	Phe	29,464	18463056	288,120	64081,16
13	His	42,015	9679412	138,940	69666,16
14		44,014	945774	0,000	0,00
15	Lys	44,932	11056857	758,429	14578,63
16		46,436	78322719	0,000	0,00
17	NH3	49,565	776590	59,550	13040,87
18	Arg	50,985	16823520	161,967	103869,75
19		59,500	808489	0,000	0,00
20		59,831	550994	0,000	0,00
21		60,812	619989	0,000	0,00
Totals			432232205	3952,169	

Foram então considerados: a amostra no tempo zero, no tempo 12 horas e no tempo 36 horas.

É muito importante, neste momento, mencionar que os principais aminoácidos presentes no soro do leite apresentaram valores extrapolados em relação ao limite de detecção do aparelho utilizado. Sendo assim, a interpretação dos dados levou em

conta somente os aminoácidos Tyr, Phe e His, pois suas bandas permitem aferir os valores das concentrações ao longo do tempo.

Para isso levamos em conta a seguinte relação:

$$C_{aa} = A_a \cdot \frac{C_p}{A_p}$$

Onde:  $C_{aa}$  = concentração do aminoácido;  $A_a$  = área do aminoácido;  $C_p$  = concentração do padrão;  $A_p$  = área do padrão. A concentração do padrão é de  $100 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$

A Tabela 8 mostra os valores referentes às concentrações dos aminoácidos ao longo do tempo de hidrólise.

**Tabela 8.** Concentração de alguns aminoácidos com áreas determinadas em função do tempo de hidrólise.

Aminoácido	Tempo de hidrólise/ horas	Concentração/ $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$
Tyr	0	21,26
	12	155,5
	24	180,0
	36	182,5
Phe	0	27,89
	12	213,6
	24	270,7
	36	288,1
His	0	56,04
	12	99,05
	24	126,9
	36	138,9

Tais aminoácidos foram escolhidos em razão de apresentarem picos com aumento gradativo ao longo do procedimento proposto e se apresentarem dentro do limite de detecção. A partir da observação da Tabela 8, infere-se que a partir de 12 horas, os aminoácidos de interesse já estavam no meio reacional e que o tempo ideal para a hidrólise nessas condições é de 24 horas. Convém dizer ainda que o procedimento adotado permitiu a reciclagem de parcela de ácido clorídrico utilizado.

Contudo, o material oriundo da hidrólise ácida do soro não foi utilizado nas sínteses realizadas nesta Dissertação, pois apresenta alguns inconvenientes como a dificuldade de se separar o material obtido e o fato do elevado volume de HCl exigido representar uma contradição no emprego da “Química Verde”, ou seja, procedimentos que não impliquem em geração de resíduos tóxicos.

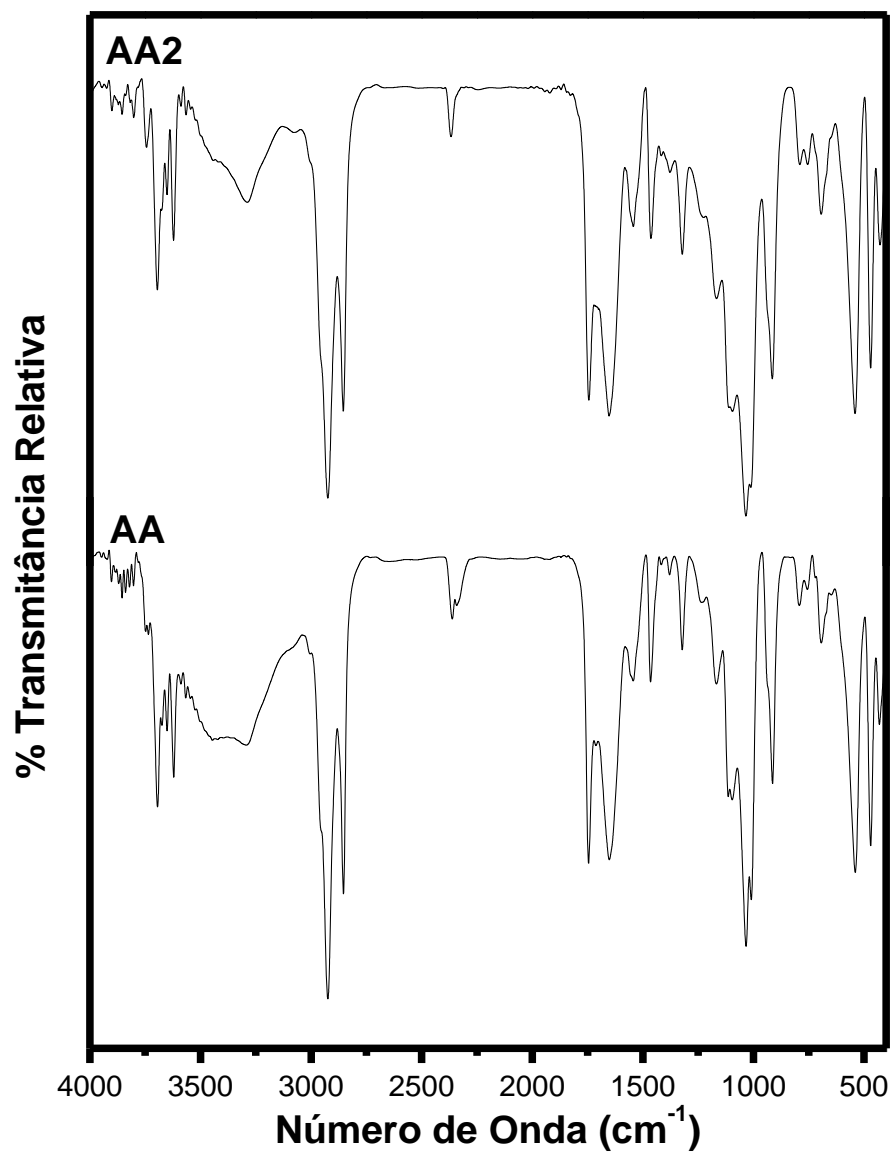
Além disso, há a possibilidade de decomposição de diversos aminoácidos ao longo desse procedimento que exige baixo pH e elevadas temperaturas.

## **4.2 COMPOSTOS DE COBRE A PARTIR DO SORO DO LEITE BOVINO HIDROLISADO ENZIMATICAMENTE**

### **4.2.1 Soro hidrolisado: amostras AA e AA2 (materiais hidrolisados)**

A Figura 25 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho dos compostos **AA** (material hidrolisado e submetido a precipitação) e **AA2** (material hidrolisado e submetido a liofilização), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 9.

Figura 25. Espectros vibracionais na região do IV dos compostos AA2 e AA (KBr).



**Tabela 9.** Principais frequências vibracionais no IV (cm<sup>-1</sup>) referentes aos compostos **AA** e **AA2** e suas respectivas atribuições <sup>50</sup>.

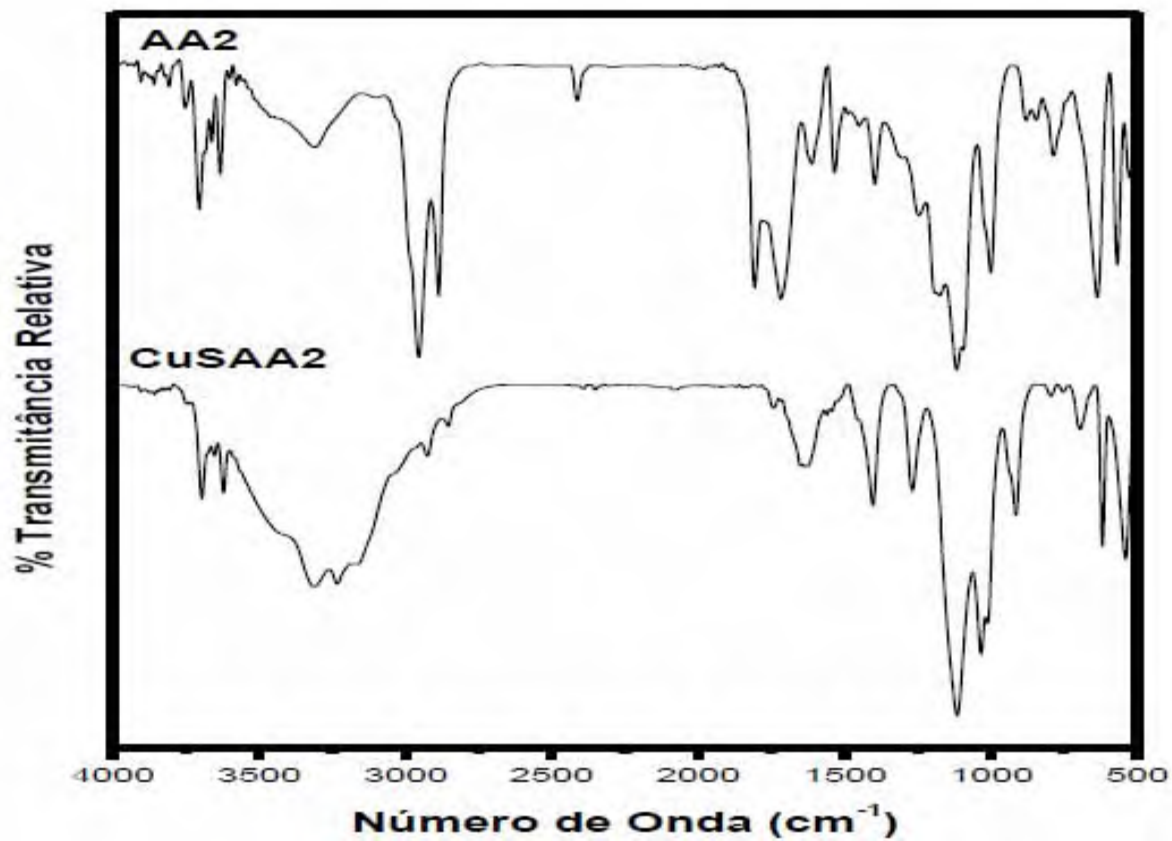
<b>AA</b>	<b>AA2</b>	<b>Atribuição</b>
3693 <i>m</i>	3695 <i>m</i>	vOH
3623 <i>m</i>	3624 <i>f</i>	vOH
3467 - 3258 <i>f</i>	3450 - 3206 <i>f</i>	H <sub>2</sub> O
2938MF	2934MF	v <sub>as</sub> NH
2851F	2849F	v <sub>s</sub> NH
1745MF	1744 MF	vC=O
1641MF	1646 MF	δ <sub>as</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
1544 <i>f</i>	1543 <i>f</i>	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>
1465 <i>m</i>	1464 <i>m</i>	v <sub>s</sub> COO <sup>-</sup>
1374mf	1374mf	δCH <sub>2</sub>
1322 <i>m</i>	1322 <i>m</i>	vCC
1157f, 1096f	1157f, 1094om	vC-N
1027 MF	1027 MF	δ <sub>r</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
908 F	915 F	v(CC) + v(CN)
756mf	755 mf	vCC
694 mf	694 <i>f</i>	ρOH
540 F	541 F	δCOO <sup>-</sup>
470 F	470 F	wagging OH + wagging CH <sub>2</sub>
431 <i>f</i>	427 <i>f</i>	δCCC

A análise dos espectros no infravermelho das amostras de **AA** e **AA2** revelou que trata-se do mesmo material. Isso porque, as duas amostras apresentam espectros vibracionais que guardam muitas semelhanças entre si.

#### 4.2.2 Composto CuSAA2.

A Figura 26 contempla os espectros vibracionais na região do infravermelho do soro hidrolisado liofilizado (**AA2**) e do quelato de cobre(II) (amostra **CuSAA2**), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 10.

**Figura 26.** Espectros vibracionais no IV dos compostos **CuSAA2** e **AA2** (em pastilhas de KBr).



**Tabela 10.** Principais frequências vibracionais no espectro IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) referentes aos compostos **CuSAA2** e **AA2** e suas respectivas atribuições<sup>50,51</sup>.

<b>CuSAA2</b>	<b>AA2</b>	<b>Atribuição</b>
3691, 3627f	3695 m, 3624 f	$\nu\text{OH}$
3313m, 3228 m	3450 - 3206 f	$\text{H}_2\text{O}$
2921 mf, 2850 mf	2924 F, 2824 F	$\nu\text{NH}$
1743 mf	1744 F	$\nu\text{C=O}$
1632m br	1646 F	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
1560mf	1543f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1404 m	1464m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
-	1374mf	$\delta\text{CH}_2$
-	1322m	$\nu\text{CC}$
1268 m	-	$\nu\text{CN} + \delta\text{NH} + \delta\text{O=C-N}$
1119MF	-	$\text{SO}_4^{-2}$
-	1157f, 1094 om	$\nu\text{CN}$
1026F	1027MF	$\delta_{\text{r}}\text{NH}_3^+$
915m	915F	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CN})$
753m	755 mf	$\nu\text{CC}$
696f	694f	$\rho\text{OH}$
618m	-	$\text{SO}_4^{-2}$
538m	541F	$\delta\text{COO}^-$
469m	470F	wagging OH + wagging $\text{CH}_2$
428f	427f	$\delta\text{CCC}$

Ao compararmos os espectros do material hidrolisado **AA2** e do composto **CuSAA2** concluímos que o grupo O-H do primeiro não coordenou ao metal, pois os valores para os  $\nu\text{OH}$  permanecem praticamente idênticos.

Em relação ao grupo C=O, observamos a ausência de variação nos valores comparativos do  $\nu\text{C=O}$  para o composto obtido e o material hidrolisado; além disso, os valores da  $\delta\text{COO}^-$  permanecem próximos a  $540 \text{ cm}^{-1}$ , tanto no ligante livre quanto no complexo.

A coordenação ocorre, então, pelo grupo  $-\text{NH}_2$ , em virtude da variação de intensidade do  $\nu\text{NH}$  em relação ao ligante livre. Esse deslocamento decorre do fato



da densidade eletrônica encontrar-se em orbitais com tendências antiligantes e à medida que o ligante diminui tal densidade ocorre o aumento da ordem de ligação.

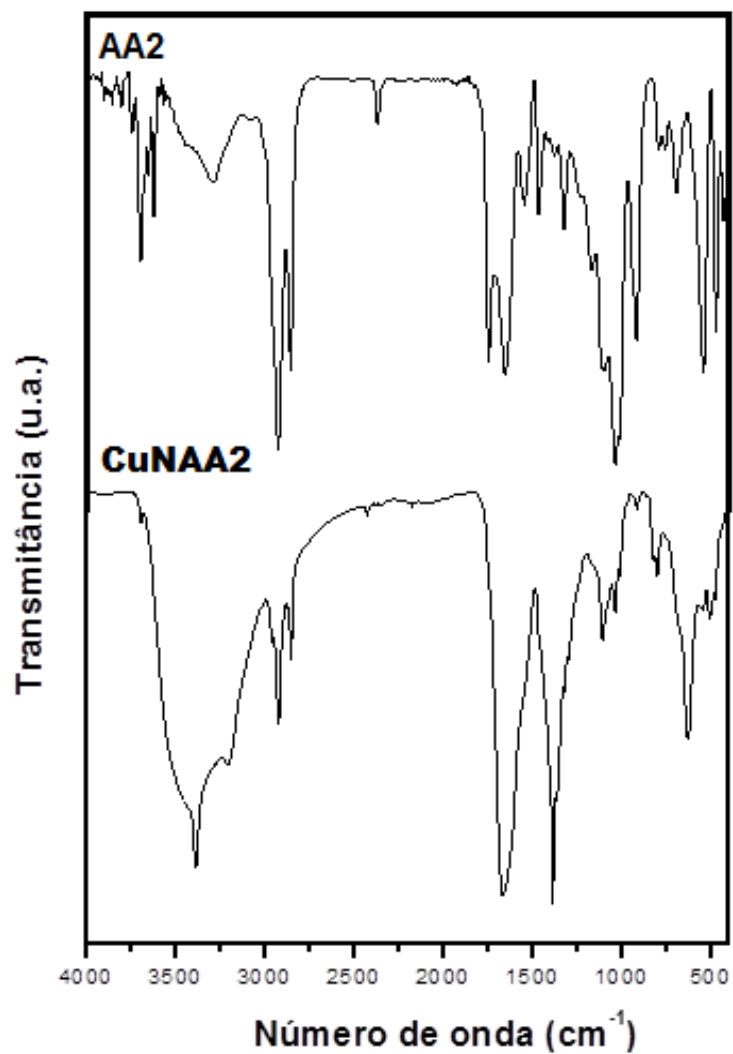
Contudo, observamos a presença de duas bandas bem intensas e características do grupo  $\text{NH}_3^+$  ( $1027$  e  $1646\text{ cm}^{-1}$ ) sugerindo que parcela dos grupos  $-\text{NH}_2$ , presentes no ligante estão protonados e, portanto, não participam da coordenação com o cobre.

Ressalta-se também a presença de sulfato coordenado no composto **CuSAA2**. No Apêndice deste trabalho serão propostas estruturas, com base na literatura, que corroboram com tal afirmação.

#### 4.2.3 Composto CuNAA2

A Figura 27 contempla os espectros vibracionais na região do infravermelho do soro hidrolisado (**AA2**) e do quelato de cobre(I) (amostra **CuNAA2**), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 12.

**Figura 27.** Espectros vibracionais no IV dos compostos **CuNAA2** e **AA2** (em pastilhas de KBr).



**Tabela 11.** Principais frequências vibracionais no espectro IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) referentes aos compostos **CuNAA2** e **AA2** e suas respectivas atribuições<sup>50,51</sup>.

<b>CuNAA2</b>	<b>AA2</b>	<b>Atribuição</b>
-	3695 <i>m</i> , 3624 <i>f</i>	$\nu\text{OH}$
3391MF, 3206 <i>f</i>	3450-3206 <i>f</i>	$\text{H}_2\text{O}$
2922 <i>m</i> , 2851 <i>m</i>	2934 MF, 2849 F	$\nu\text{NH}$
-	1744 MF	$\nu\text{C=O}$
1660 MF, <i>br</i>	1646 MF	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
-	1543f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1382 MF	1464 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
-	1374mf	$\delta\text{CH}_2$
1318 <i>mf</i>	1322 <i>m</i>	$\nu\text{CC}$
1290 <i>mf</i>	-	$\nu\text{CN} + \delta\text{NH} + \delta\text{O=C-N}$
1104 <i>f</i>	1157f, 1094 <i>om</i>	$\nu\text{CN}$
1026 <i>f</i>	1027 MF	$\delta_{\text{r}}\text{NH}_3^+$
914 <i>mf</i>	915F	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CN})$
799 <i>mf</i>	755 <i>mf</i>	$\nu\text{CC}$
626 F	694f	$\rho\text{OH}$
549 <i>mf</i>	541 F	$\delta\text{COO}^-$
470 <i>mf</i>	470 <i>m</i>	<i>wagging</i> OH + <i>wagging</i> $\text{CH}_2$
-	427f	$\delta\text{CCC}$

A análise do espectro revela que a coordenação para o composto **CuNAA2** ocorre via grupo  $-\text{OH}$  e neste caso nota-se a presença de banda intensa para o  $\nu\text{OH}$  somente nos ligantes livres.

Para o grupo  $\text{C=O}$ , a presença do  $\nu\text{C=O}$  em  $1744 \text{ cm}^{-1}$  somente para o ligante livre, sugere o que o grupo carboxilato é o sítio de coordenação com o cobre. Corroborando com esse resultado, a banda associada ao modo vibracional  $\delta\text{OCO}$  muda de  $541 \text{ cm}^{-1}$  para  $549 \text{ cm}^{-1}$  no complexo obtido.

Finalmente, o grupo  $-\text{NH}_2$  do hidrolisado não apresenta indícios de coordenação, pois seus modos vibracionais permanecem idênticos ao do composto sintetizado. E em concordância com esse resultado, aparecem as bandas referentes

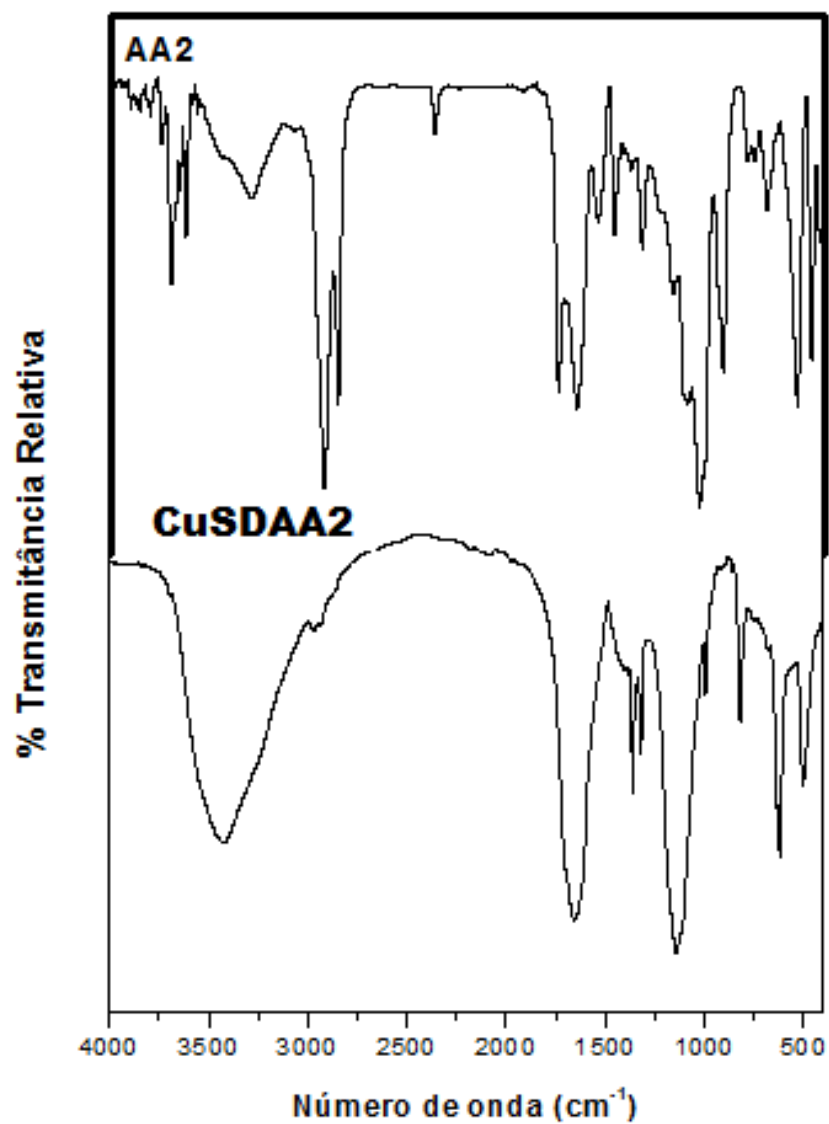
ao grupo  $\text{-NH}_2$  protonado ( $1026$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ ), evidenciando, portanto, que o par de elétrons sobre o átomo de nitrogênio não pode estar coordenado ao metal.

Salienta-se que o grupo  $\text{NO}_3^-$  não coordena ao centro metálico e a redução deste a íon cobre (I), verificada nesta rota sintética adotada, pode ter sido promovida pelos peptídeos e aminoácidos (compostos polifuncionais) presentes no meio reacional.

#### 4.2.4 Compostos **CuSDAA2**

A Figura 28 contempla o espectro vibracional na região do infravermelho do quelato de cobre(II) (amostra **CuSDAA2**), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 13.

**Figura 28.** Espectros vibracionais no IV dos compostos **CuSDAA2** e AA2 (em pastilhas de KBr).



**Tabela 12.** Principais frequências vibracionais no espectro IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) referentes aos compostos CuSDAA2 e AA2 e suas respectivas atribuições<sup>50, 51</sup>.

CuSDAA2	AA2	Atribuição
-	3695 <i>m</i> , 3624 <i>f</i>	$\nu\text{OH}$
3413F, 3228om	3450-3206 <i>f</i>	$\text{H}_2\text{O}$
2968 <i>mf</i> , 2928 <i>mf</i>	2934 MF, 2849 <i>F</i>	$\nu\text{NH}$
-	1744 <i>F</i>	$\nu\text{C=O}$
1653 <i>F</i> , <i>broad</i>	1646 <i>F</i>	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
-	1543f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1362 <i>m</i>	1464 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
-	1374mf	$\delta\text{CH}_2$
1323 <i>m</i>	1322 <i>m</i>	$\nu\text{CC}$
1140 MF	-	$\text{SO}_4^{2-}$
-	1157f, 1094 <i>om</i>	$\nu\text{CN}$
-	1027 MF	$\delta_{\text{r}}\text{NH}_3^+$
-	915 <i>F</i>	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{CN})$
990 <i>mf</i>	-	$\delta\text{NH}$
820 <i>m</i>	-	$\delta\text{OCO}$
749mf	755 <i>mf</i>	$\nu\text{CC}$
681 <i>mf</i>	694 <i>f</i>	$\rho\text{OH}$
627 <i>F</i>	-	$\text{SO}_4^{2-}$
506 <i>m</i>	541 <i>F</i>	$\delta\text{OCO}$
-	470 <i>F</i>	<i>wagging</i> OH + <i>wagging</i> CH <sub>2</sub>
-	427 <i>f</i>	$\delta\text{CCC}$

Para o composto **CuSDAA2** sugere-se a coordenação via grupos  $-\text{OH}$ , devido a presença de banda intensa somente no ligante livre.

Já o carboxilato é sítio de ligação em virtude da presença de sinal somente para o ligante livre. Além disso, a  $\delta\text{OCO}$  tem seu seus valores alterados de  $541 \text{ cm}^{-1}$  (ligante livre) para  $506 \text{ cm}^{-1}$  (complexo).

A coordenação ocorre via N-H e, portanto, não aparecem no espectro desse composto bandas associadas aos grupos N-H protonados a exemplo da banda em  $1027 \text{ cm}^{-1}$ . Salienta-se também, neste caso, a presença de íons sulfato.

#### 4.2.5 Complexometria com EDTA

Pelo fato dos ligantes (oriundos do hidrolisado enzimático do soro do leite bovino) serem uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos haverá então, a possibilidade de diversas formas de quelação entre os diversos constituintes presentes e conseqüentemente formação de vários compostos.

Sendo assim, diversas percentagens de Cu(II) poderiam ser encontradas. Contudo, para efeito de cálculos, consideraremos o glutamato como o principal constituinte do soro. A partir daí, inferimos com base na complexometria, que para **CuSAA2** a porcentagem de Cu(II) é de 19,46%, para **CuNAA2** é de 34,35% e de **CuSDAA2** é de 14,48%.

Cabe mencionar que quelatos comerciais de cobre(II) contendo aminoácidos, preparados com o mesmo objetivo de suplementação alimentar, apresentam também teor de metal em torno de 10-20%<sup>52</sup>. Sendo assim, em breve, os compostos **CuSDAA2** e **CuSAA2** obtidos neste trabalho participarão de ensaios zootécnicos.

#### 4.2.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica

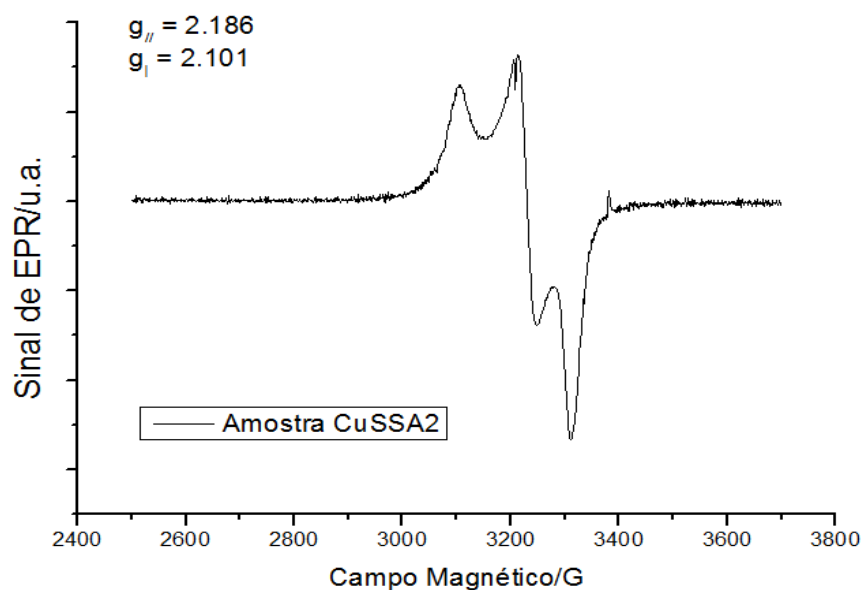
##### Compostos CuSAA2

Espectros de EPR podem auxiliar na análise da geometria de coordenação de sistemas paramagnéticos e explicar a natureza das distorções das simetrias ideais.

Sendo assim, foi obtido o espectro para o compostos **CuSAA2** (ver Figura 29) que permite sugerir a presença de íons Cu(II) octaedricamente coordenados, com o octaedro alongado na direção axial, uma vez que nenhum dos dois valores de g, em cada espectro, é igual a  $g = 2,00$ <sup>53</sup>. Em outras palavras, como foi obtida a relação  $g_{||} > g_{\perp}$ , conclui-se que deva se tratar de um complexo tetragonal, com o elétron desemparelhado no estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$ .

Além disso, nenhuma banda correspondente às transições  $\Delta M_s = \pm 2$  (em campo  $\sim 1500G$ ) foi observada no espectro, sugerindo que não haja interação Cu-Cu<sup>54</sup>.

**Figura 29.** Espectro EPR dos compostos de cobre(II) **CuSAA2**.



Cabe dizer, ainda, que o espectro de EPR pode ajudar também a elucidar o número de espécies presentes em solução. No entanto, isso não foi possível nesse caso uma vez que a amostra mostrou ser completamente insolúvel nos solventes metanol ou DMSO, impossibilitando, portanto, seu registro em solução.

### Composto **CuNAA2**

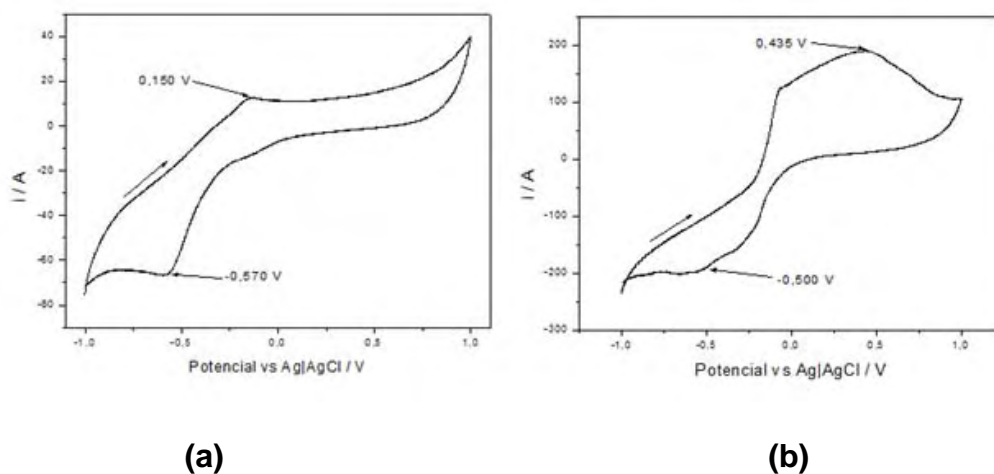
Para o composto **CuNAA2** não foi observado nenhum sinal em seu espectro EPR, confirmando mais uma vez tratar-se de material com cobre no estado de oxidação 1+.

#### 4.2.7 Voltametria Cíclica

Para ajudar na identificação dos estados de oxidação dos metais presentes nos complexos sintetizados, foram realizadas análises voltamétricas utilizando-se:  $[\text{CuCl}(\text{PPh}_3)_3]$  – complexo de cobre(I) <sup>55</sup>, (Figura 30 (a)) e (b)  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Figura 30 (b)) como padrão, para efeito de comparação. As Figuras a e b mostram o perfil voltamétrico dos centros metálicos Cu(I) e Cu(II), respectivamente.

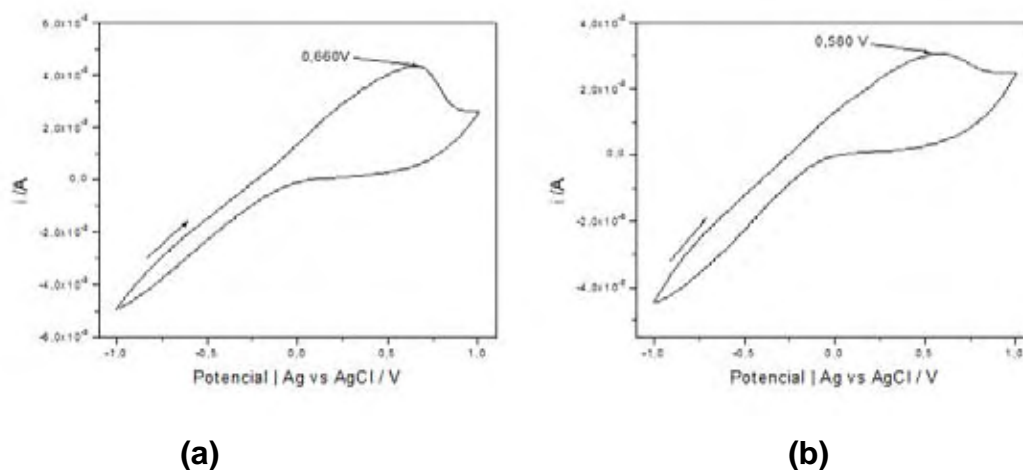


**Figura 30.** Voltamogramas cíclicos de  $[\text{Cu}(\text{Cl}(\text{PPh}_3)_3)]$  (a);  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (b).



Para os complexos obtidos neste trabalho a análise voltamétrica serviu como forma de definir a presença do centro metálico nos compostos obtidos, devido à presença de picos de oxidação característicos com valores de 0,660V para **CuSAA2** (Figura 31 (a)) e 0,580V para **CuNAA2** (Figura 31 (b)).

**Figura 31.** Voltamogramas cíclicos para eletrodo de pasta de carbono modificado com os complexos **CuSDAA2** (a) e **CuNAA2** (b).



Assim, observa-se que os compostos sintetizados apresentam perfil voltamétrico semelhantes ao sal de cobre (II). Isto corrobora a presença do metal nesse estado de oxidação para os complexos sintetizados.

Contudo, esta análise não pode ser conclusiva para os compostos **CuNAA2**, pois as condições experimentais da voltametria promovem a oxidação do Cu(I), como também pode ser demonstrado pela análise da Figura 32.

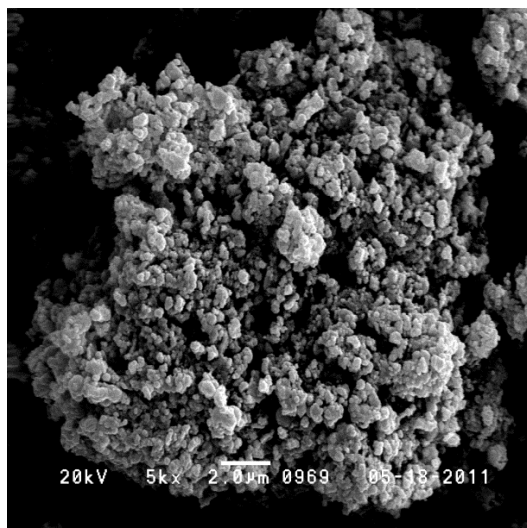
**Figura 32.** (a) Ampola selada sob atmosfera inerte, **CuNAA2** apresenta tonalidade alaranjada. Em (b), o material com tonalidade verde escuro, resultado da oxidação em sistema aberto.



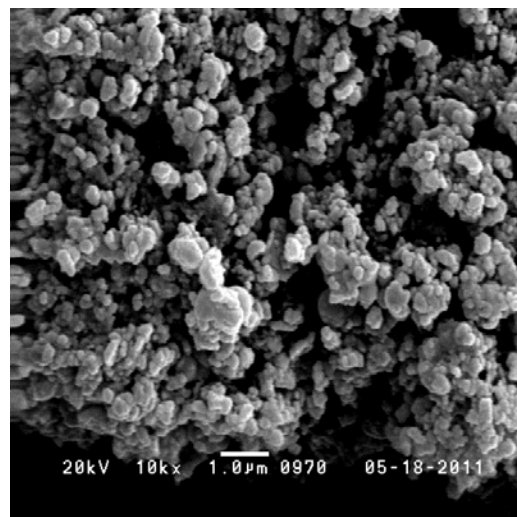
#### 4.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia e tamanho de partícula dos compostos **CuNAA2** (Figura 33) e **CuSAA2** (Figura 34) foram investigados via MEV.

**Figura 33.** Imagens MEV de **CuNAA2** com ampliação de 5.000 vezes (a); 10.000 vezes (b).

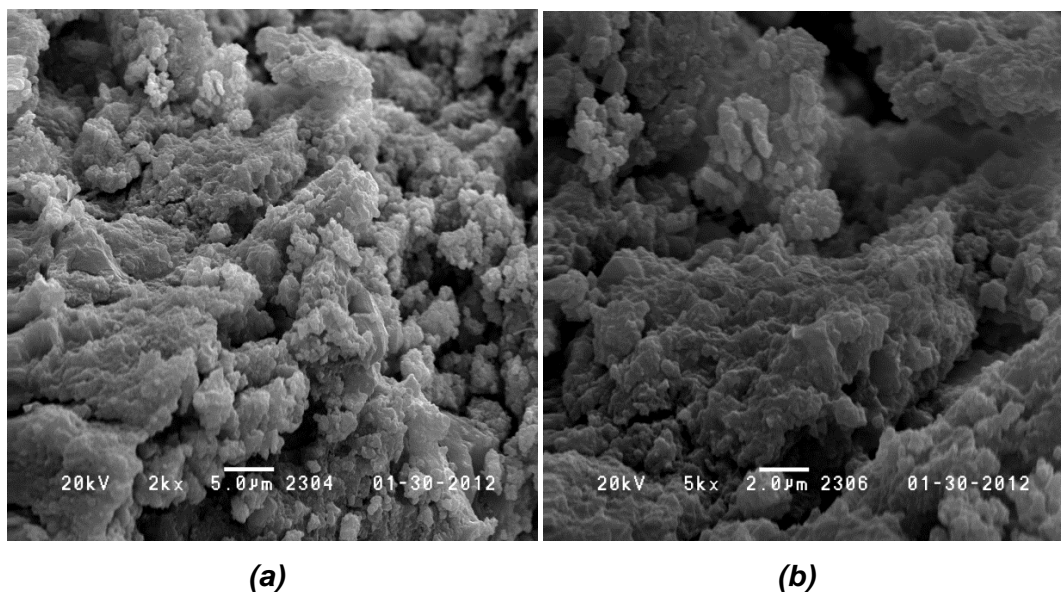


(a)



(b)

**Figura 34.** Imagens MEV de **CuSAA2** com ampliação de 2.000 vezes (a); 5.000 vezes (b).



Para ambas as amostras, a primeira observação importante é que tratam-se de uma única fase, não tendo sido observada, portanto, a presença de excesso de partículas do ligante ou do precursor.

Para o composto de cobre(I) (**CuNAA2**), observa-se um aglomerado de partículas com tendência a esfericidade e diâmetro da ordem de 0,5  $\mu\text{m}$ .

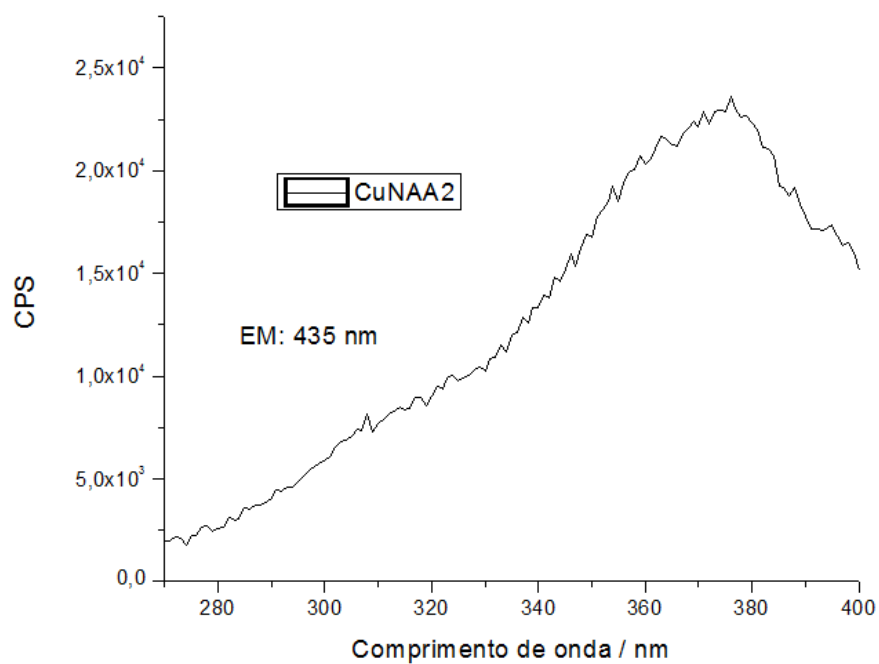
Já para o composto **CuSAA2**, pode-se notar que o pó também se apresenta na forma de aglomerados de partículas uniformes, porém nesse caso de tamanho bem menor do que aquelas observadas para o composto de cobre(I).

#### 4.2.9 Espectroscopia de Luminescência

Como esperado, o sólido de cobre(I) de cor amarela, amostra **CuNAA2**, quando excitado na câmara de ultravioleta, exibe emissão na cor verde, visualmente detectada a olho nu. Por essa razão, resolvemos investigar a propriedade fotofísica que o composto apresentava, mesmo sabendo das dificuldades operacionais por se tratar de um composto muito instável ao ar.

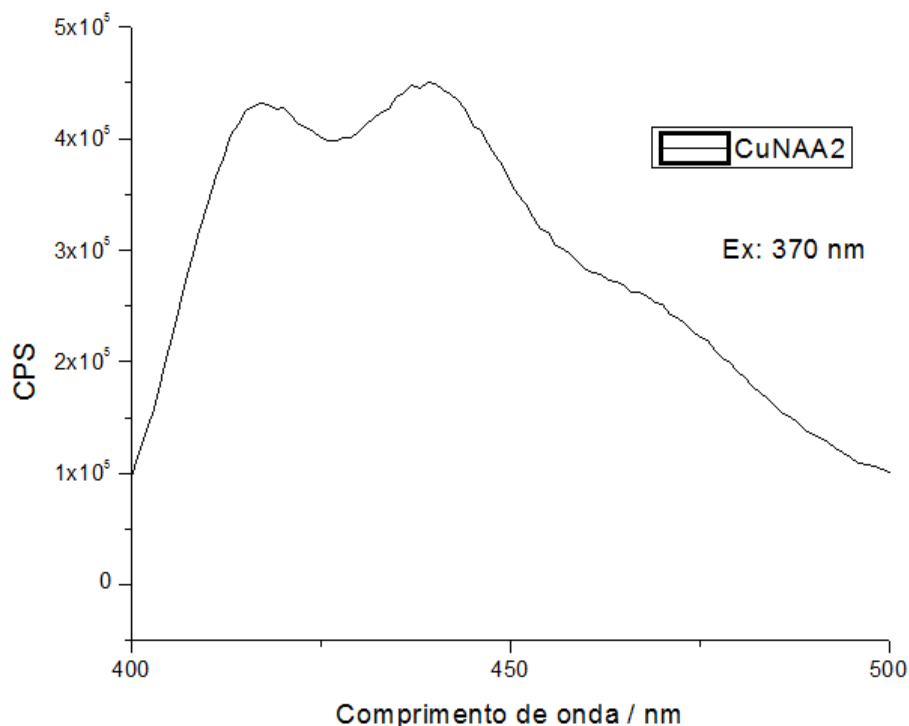
A Figura 35 apresenta o espectro de excitação dos compostos **CuNAA2**.

**Figura 35.** Espectro de excitação ( $\lambda_{em} = 435,5\text{nm}$ ) do composto **CuNAA2** (fenda de excitação e emissão, respectivamente, iguais a 1 e 2 nm; incremento de 1 nm/s com tempo de integração de 0,25 s).

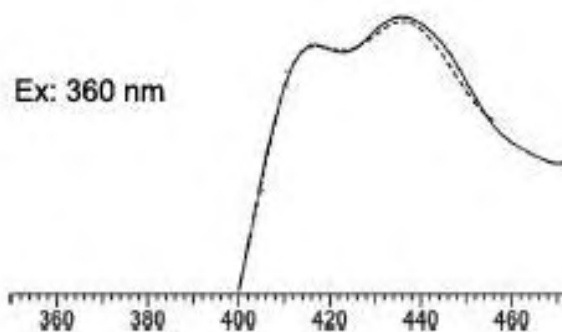


As Figuras 36 e 37 mostram os espectros de emissão dos compostos **CuNAA2** e do complexo de cobre(I) obtido por Starosta e colaboradores <sup>56</sup>.

**Figura 36.** Espectro de emissão ( $\lambda_{exc} = 370$  nm) do composto **CuNAA2** a temperatura ambiente (fenda de excitação e emissão respectivamente de 2 e 5 nm, incremento de 1 nm/s com tempo de integração de 0,25s).



**Figura 37.** Espectro de emissão ( $\lambda_{exc} = 360$  nm) do complexo de cobre(I) obtido por Starosta et. al. à temperatura ambiente <sup>56</sup>.



Na Figura 37, pode-se observar uma banda larga e intensa centrada em aproximadamente 370nm quando fixado a leitura de emissão em 435nm. Decidiu-se, então, fixar a excitação nesse comprimento de onda para observar o espectro de emissão do composto (ver Figura 36), sendo que este apresentou bandas características de cobre(I), em concordância com as relatadas por Starosta e colaboradores para o complexo  $[CuI(dmp)P(CH_2N(CH_2CH_2)_2O)_3]$  (dmp = 2,9-dimetil-

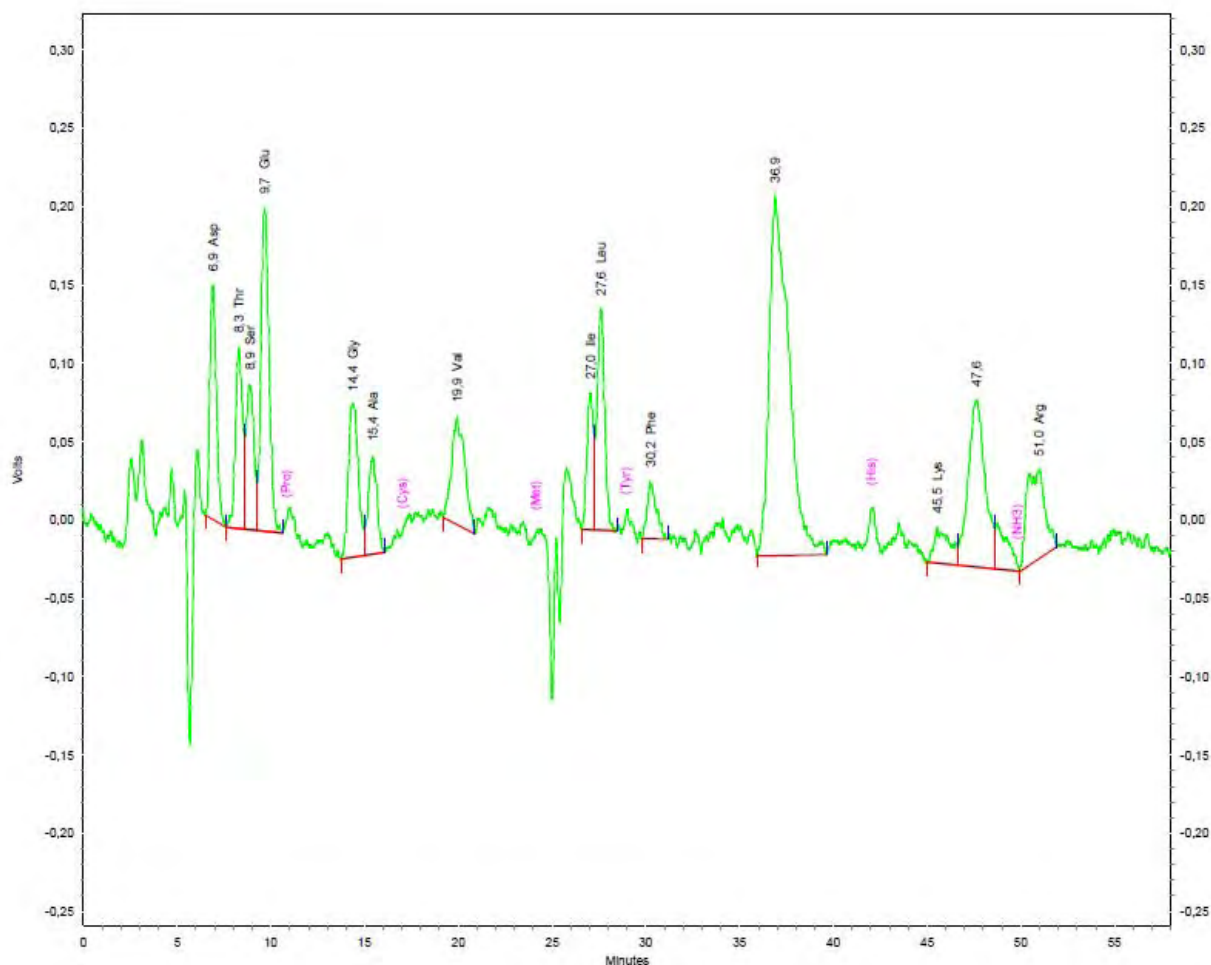
1,10-fenantrolina) Como revelado pela Fig. 34, podem ser observadas duas bandas de emissão na região do azul (417 e 439 nm), atribuídas a estados excitados de transferência de carga metal-ligante, provavelmente  $^3\text{TCLM}$ , envolvendo orbitais 3d do cobre e orbitais  $\pi^*$  dos ligantes.

#### **4.3 Hidrólise ácida completa dos compostos de cobre: tentativa de identificação da composição do hidrolisado via análise cromatográfica**

Segundo Morais e colaboradores <sup>57</sup>, hidrolisados de caseína apresentam perfis cromatográficos que podem ser separados em até quatro frações: peptídeos que contêm mais do que sete resíduos de aminoácidos, frações de 4 a 7 resíduos, frações de di- e tripeptídeos e, por último, a fração de aminoácidos livres.

Dentro desse contexto, efetuou-se, então, a hidrólise seguida da análise cromatográfica dos compostos de cobre obtidos neste trabalho. Como será detalhado a seguir, o estudo revelou a presença de aminoácidos livres como o glutamato e o aspartato, além de frações de peptídeos que podem variar entre pequenos e médios. As Figuras 38-40 demonstram a diversidade de ligantes disponíveis para a formação desses complexos.

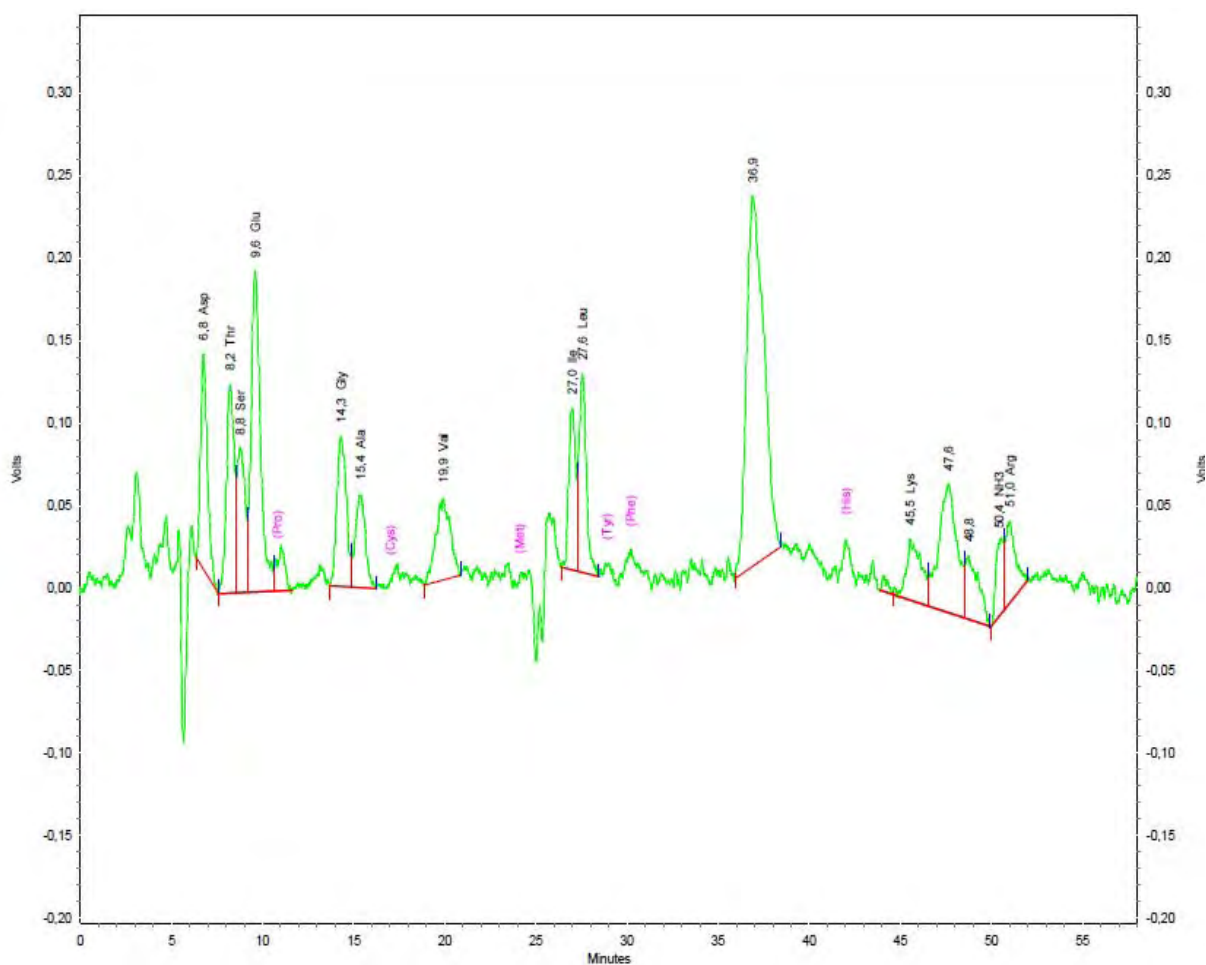
**Figura 38.** Aminograma do produto da hidrólise do composto **CuNAA2**



Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,897	3595378	59,248	60683,67
2	Thr	8,288	3155431	27,726	113807,37
3	Ser	8,863	2630613	25,046	105031,45
4	Glu	9,656	6118361	82,150	74478,35
5	Gly	14,378	3654566	30,253	120798,47
6	Ala	15,434	1999929	18,476	108245,79
7	Val	19,923	3327720	29,152	114150,04
8	Ile	27,031	2191896	20,716	105804,62
9	Leu	27,594	3834950	47,293	81089,87
10	Phe	30,226	1242657	13,041	95288,98
11		36,892	16594645	0,000	0,00
12	Lys	45,542	1327815	50,734	26172,01
13		47,635	6653716	0,000	0,00
14	Arg	50,976	3896002	33,701	115603,41
15		62,116	6916414	0,000	0,00
16		63,625	2287827	0,000	0,00
<b>Totals</b>			<b>69427919</b>	<b>437,536</b>	

**Figura 39.** Aminograma do produto da hidrólise do composto **CuSDAA2**

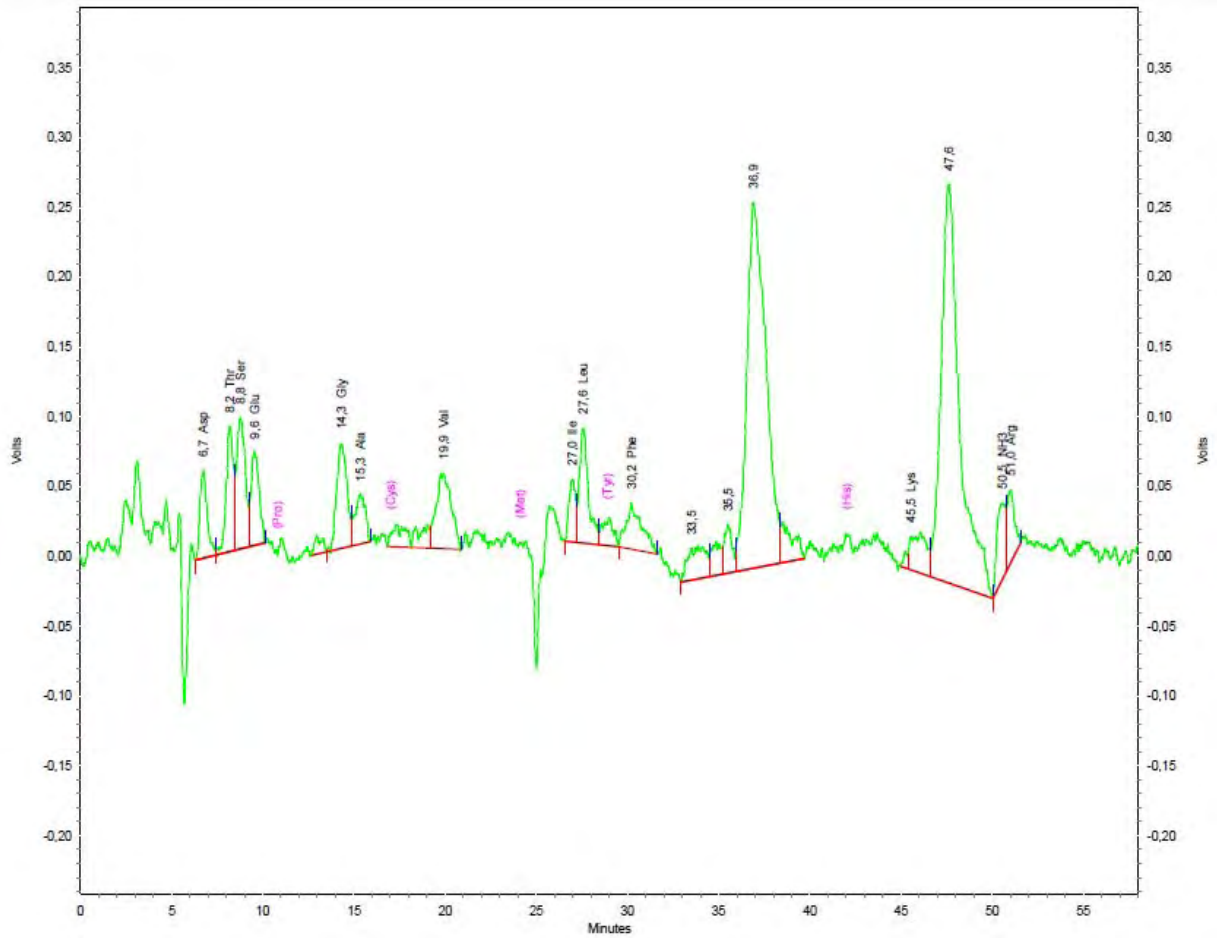


Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,759	3375782	55,629	60683,67
2	Thr	8,219	3887892	34,162	113807,37
3	Ser	8,775	2644371	25,177	105031,45
4	Glu	9,604	6896619	92,599	74478,35
5	Gly	14,306	3378253	27,966	120798,47
6	Ala	15,382	2123117	19,614	108245,79
7	Val	19,909	2721698	23,843	114150,04
8	Ile	26,998	2646161	25,010	105804,62
9	Leu	27,558	3323635	40,987	81089,87
10		36,893	14753754	0,000	0,00
11	Lys	45,540	2126452	81,249	26172,01
12		47,636	5429885	0,000	0,00
13		48,750	1980222	0,000	0,00
14	NH3	50,417	1267345	16,176	78346,77
15	Arg	50,991	1985026	17,171	115603,41
16		62,319	8214071	0,000	0,00
Totals			66754282	459,583	



**Figura 40.** Aminograma do produto da hidrólise do composto **CuSAA2**



Fluorescência  
(Ex:350nm, Em:450nm)

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Asp	6,744	1728104	28,477	60683,67
2	Thr	8,195	2525484	22,191	113807,37
3	Ser	8,773	3010641	28,664	105031,45
4	Glu	9,564	2098213	28,172	74478,35
5	Gly	14,304	2939291	24,332	120798,47
6	Ala	15,345	1416656	13,087	108245,79
7	Val	19,908	3087653	27,049	114150,04
8	Ile	26,977	1173347	11,090	105804,62
9	Leu	27,562	2801102	34,543	81089,87
10	Phe	30,215	1955982	20,527	95288,98
11		33,500	1614646	0,000	0,00
12		35,496	1070783	0,000	0,00
13		36,905	18877761	0,000	0,00
14	Lys	45,542	1725711	65,937	26172,01
15		47,615	20133693	0,000	0,00
16	NH3	50,542	1896811	24,210	78346,77
17	Arg	51,001	1429879	12,369	115603,41
18		62,327	10367096	0,000	0,00
19		63,542	2360191	0,000	0,00

<b>Totals</b>			<b>82213043</b>	<b>340,649</b>	
---------------	--	--	-----------------	----------------	--

O pico não identificado, que aparece em 36,9 minutos, possivelmente refere-se às frações de pequenos e médios peptídeos não determinados pelo padrão utilizado.

A perspectiva a ser considerada é a de que diversos complexos, dentre eles compostos foram sintetizados a partir dos diferentes aminoácidos e de pequenos e médios peptídeos provenientes da hidrólise do soro do leite bovino. Complexos de diversas geometrias, com o centro metálico adquirindo diferentes modos de coordenação podem teoricamente ser obtidos em razão das diferentes condições reacionais empregadas (pH, precursor, razão molar metal : ligante, atmosfera reacional, solvente, etc.).

No trabalho de Sgarbieri <sup>28</sup>, é apresentada a estrutura primária da  $\beta$ -lactoglobulina A, principal proteína presente no soro do leite. A Figura 41 mostra tal peptídeo e suas variantes.

**Figura 41.** Estrutura primária da  $\beta$ -lactoglobulina A (diferenciando-se das variantes B e C) <sup>28</sup>.



A partir da análise da estrutura da principal proteína do soro, podemos perceber a grande variedade de pequenos e médios peptídeos que poderiam constituir os ligantes de nossas sínteses.

Contudo, de maneira sugestiva, no Apêndice deste trabalho esboçamos algumas possibilidades de coordenação levando em consideração os dados da complexometria, dos IV's e da EL realizados.

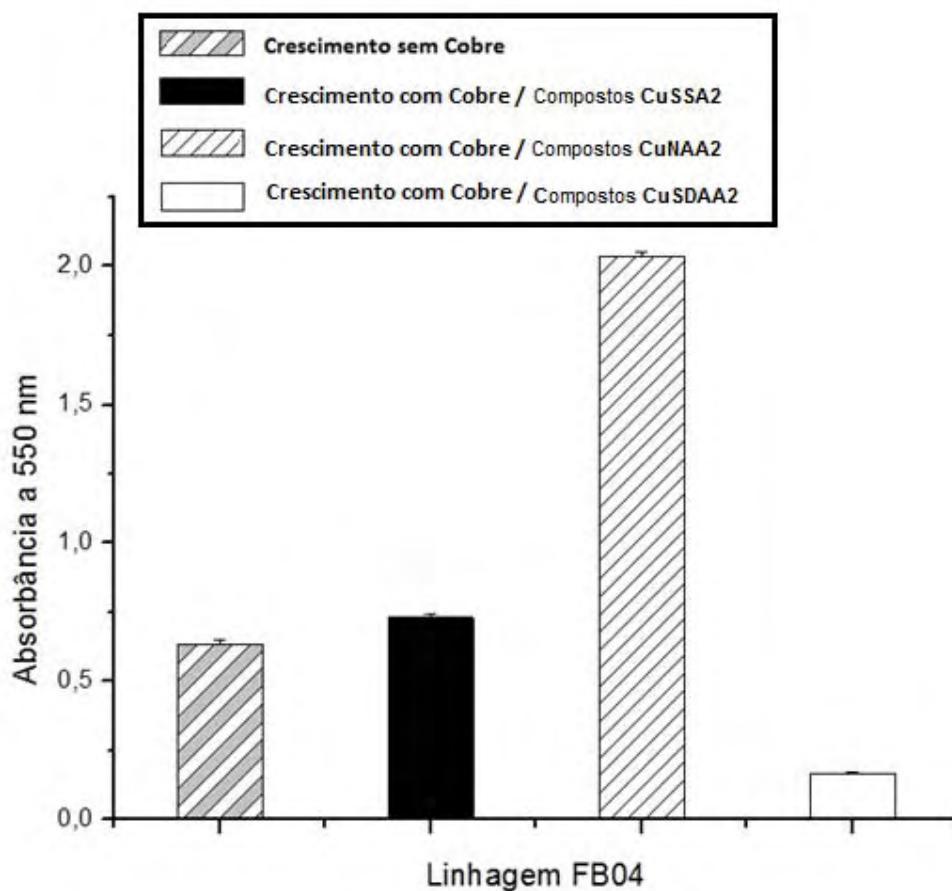
#### 4.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

##### 4.4.1 Testes biológicos preliminares: Avaliação de resistência a cobre em *Xcc* (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

Para a avaliação de resistência a cobre, o isolado de *Xcc* FB04 foi rejuvenescido em meio TSA sólido (triptona 1%, sacarose 1% e glutamato de sódio 0,1%), pré-inoculado em meio nutriente tamponado (extrato de carne 0,2%, peptona 0,5% e NaCl 0,5%, pH 6,8) e um volume do pré-inóculo correspondente à densidade óptica de 0,5 a 550 nm foi transferido para novo meio nutriente tamponado, agora na ausência ou presença de complexos de Cu, correspondentes a 410  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos complexos **CuSAA2**, a 2820  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos complexos **CuNAA2** e a 906  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos complexos **CuSDAA2** em meio de cultura. A avaliação do crescimento celular (28°C e 200 rpm) foi realizada por análises de turbidimetria, em triplicata, a 550 nm após 24 horas. A média dos resultados desse crescimento celular, para o isolado de *Xcc* FB04 com os respectivos desvios padrão está apresentada na Figura 42.

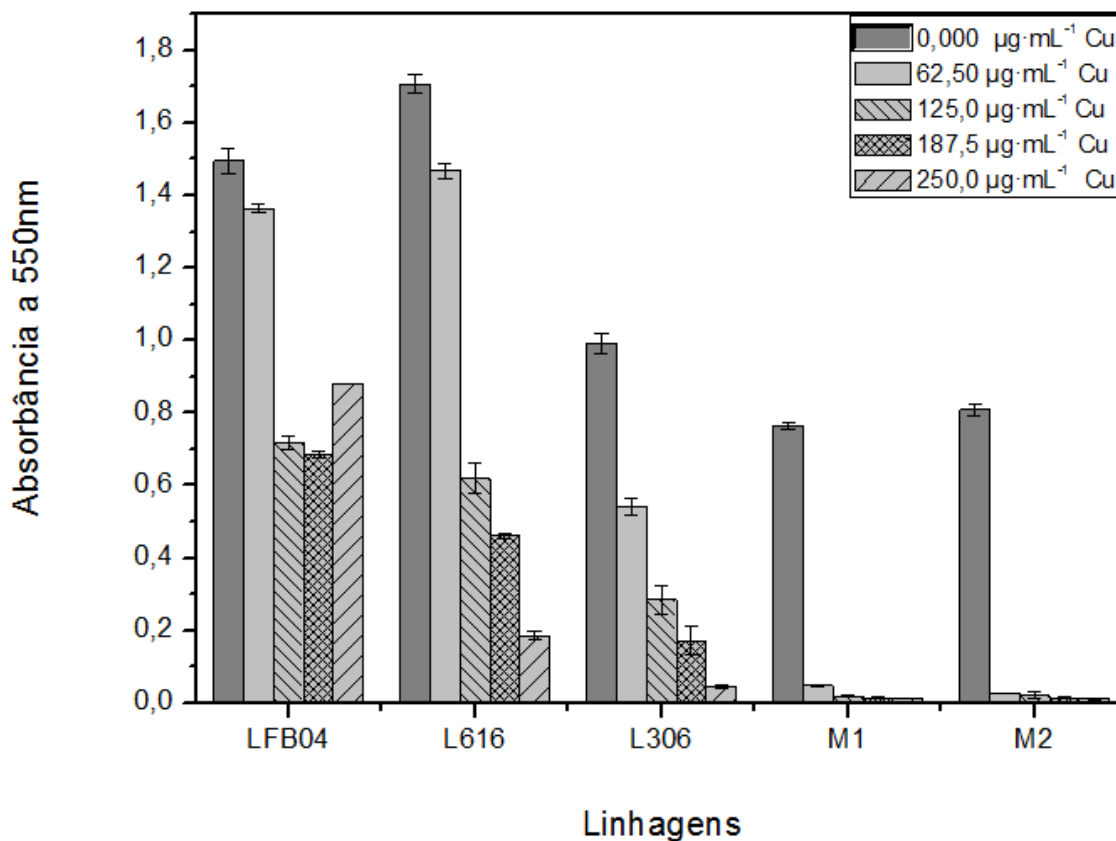
Os diferentes valores de concentração se justificam em razão da facilidade de solubilização dos materiais analisados nos testes preliminares, e apesar da variação nos valores das concentrações, ressalta-se o fato de que os dados da literatura<sup>33</sup> estabelecem que estirpes mutantes são incapazes de se desenvolver em meio de cultura contendo cobre, mesmo com a menor concentração de  $\text{CuSO}_4$  testada (0,25 mM). Desta forma, temos indícios a cerca da potencialidade dos compostos obtidos em inibir o crescimento dessa bactéria.

**Figura 42.** Crescimento celular para a linhagem FB04 de *Xcc*, em meio Nutriente Agar tamponado, sem cobre e com os compostos **CuSAA2**, **CuNAA2** e **CuSDAA2** nas concentrações 410, 2820 e 906  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



Em termos comparativos, a Figura 43 mostra o crescimento celular para linhagens de *Xcc*, em meio Nutriente tamponado, sem cobre e com  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  nas concentrações de 62,5; 125,0; 187,5 e 250,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As amostras celulares foram coletadas após 24h de crescimento a 28°C sob agitação de 200 rpm e o crescimento avaliado por turbidimetria a 550 nm.

**Figura 43.** Crescimento celular para linhagens de *Xcc*, indicada na figura, em meio Nutriente tamponado, sem cobre e com  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  nas concentrações de 62,5; 125,0; 187,5 e 250,0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .



Observa-se então que a linhagem *Xcc* FB04 apresenta grande resistência ao cobre, e que o composto **CuSDAA2** apresenta eficácia frente à mesma ao contrário dos outros compostos testados.

Futuramente, numa segunda fase de ensaios biológicos, serão repetidos experimentos com a linhagem de *Xcc* FB04 com os complexos de cobre obtidos, todos adicionados a concentração de 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (em triplicata), sob condições estéreis. Para isso, os complexos de cobre serão esterilizados por filtração antes da adição ao meio nutriente contendo a linhagem bacteriana de *Xcc*.

## CONCLUSÃO

Este trabalho é pioneiro e contempla uma perspectiva multidisciplinar dentro dos estudos que vem sendo realizados no Grupo de Química de Coordenação e Organometálicos deste Instituto. Sua ação percorre desde os conceitos mais fundamentais da Química de Coordenação até o campo da Bioquímica, passando também pelo contexto ambiental - em relação ao soro do leite enquanto produto de descarte da indústria de laticínios -, além das perspectivas de aplicação dos compostos obtidos como metalofármacos e/ou substâncias nutracêuticas.

Podemos separar o trabalho realizado em duas etapas principais. A primeira, referente à obtenção, hidrólise e análise do soro do leite bovino, como fonte de ligantes naturais, enquanto que a segunda está relacionada aos aspectos de síntese e estudo de compostos de coordenação. Além disso, demos início recentemente aos estudos envolvendo a potencialidade de aplicação biológica desses sistemas.

Na primeira parte, então, verificamos inicialmente que tanto o método da precipitação quanto o da liofilização foram eficientes para a obtenção do hidrolisado no estado sólido, além de terem conduzido essencialmente ao mesmo material de trabalho. Quanto aos processos de hidrólise empregados, mesmo embora ainda não tenhamos conseguido as condições “ideais” (natureza e concentração das enzimas, tempo de reação, etc.) para uma hidrólise enzimática completa – o que acarretou na presença de pequenos peptídeos junto com os aminoácidos livres -, a idéia continua sendo a de evitar o uso da hidrólise ácida porque além de poluir, vai fornecer os aminoácidos que já são conhecidos da literatura.

No campo da Química de Coordenação, foram obtidos três novos materiais de cobre, de diferentes valências, a partir da interação entre precursores de cobre(II) e o soro hidrolisado enzimaticamente. Portanto, as alterações nas rotas sintéticas propostas bem como nas condições experimentais (material de partida, solvente, pH) foram cruciais para que esses resultados pudessem ser alcançados e destacassem-se pelo fato de serem reprodutíveis.

Cabe também frisar que quelatos comerciais de cobre(II) contendo aminoácidos, preparados com o objetivo de suplementação alimentar, apresentam teor de metal em torno de 10-20%. Para os compostos **CuSDAA2** e **CuSAA2** os

valores encontrados foram de 14,48% e 19,46%, o que demonstra a grande capacidade desses materiais, frente a testes zootécnicos.

Tal comportamento deve-se à utilização de um sistema polifuncional que assume grande capacidade de coordenação a centros metálicos e assim sendo, temos a convicção de que novos e importantes compostos serão obtidos de maneira a compor uma lista multimineral a ser testada em sistemas biológicos e que poderá apresentar grande viabilidade comercial num futuro próximo.

Cabe destacar ainda, a responsabilidade ambiental associada a esse tipo de estudo, no sentido de se evitar o descarte excessivo de soro de leite (subproduto da indústria de laticínios, altamente protéico) sem nenhum tratamento nos rios e afluentes. Testes de hidrólise ácida foram realizados, contudo a via enzimática foi adotada, objetivando assim a aplicação de uma “Química Verde”, sem geração de quantidade excessivas de resíduos tóxicos ao ambiente.

## PERSPECTIVAS e TRABALHO FUTUROS

(1) Desde 1950, o EDTA tem sido utilizado como um agente complexante em tratamentos de envenenamento por metais. No entanto, devido à sua baixa seletividade ele também complexa metais essenciais ao organismo, tornando-se necessária a reposição desses sais minerais após sua administração. Os  $\alpha$ -aminoácidos têm sido amplamente utilizados como agentes quelantes para esta finalidade. No entanto, eles são muito caros e só são eficazes em forma injetável <sup>58</sup>. A busca de materiais com elevada capacidade de complexação, baixo custo, baixa toxicidade em água, solúveis em meio aquoso e seletivos tem sido objeto de estudos em diferentes áreas de conhecimento <sup>59</sup>. Em razão do soro do leite ser considerado um descarte da indústria de laticínios e constituir um sério problema ao meio ambiente quando descartado em corpos d'água, este material após submetido à hidrólise pode constituir uma via alternativa ao uso do EDTA.

Nos trabalhos de Santos e colaboradores <sup>60</sup> o potencial de complexação das Substâncias Húmicas (SH) é avaliado em razão das mesmas apresentarem grande número de grupos funcionais, especialmente os carboxílicos e hidroxílicos. Tais grupos apresentam a capacidade de agir como agentes complexantes de espécies metálicas em situações de envenenamento. Sendo assim, da mesma forma que as SH foram utilizadas por Santos, em um futuro próximo, poderemos estender tais testes ao soro do leite bovino hidrolisado (SLBH). Segundo a metodologia proposta por esses autores, um sistema de ultrafiltração para determinar a capacidade de complexação do soro do leite hidrolisado por via enzimática poderá ser testado. Para isso será utilizado um filtro fechado de Teflon que é capaz de suportar determinada pressão. O soro circulará por este filtro com auxílio de uma bomba peristáltica. Para obter o filtrado, será exercida determinada pressão ao sistema por meio de uma pinça de Mohr. O filtrado será recolhido. Possivelmente, o soro hidrolisado não passará pelo filtro, pois a membrana de celulose que será utilizada deverá apresentar massa de 1 kDa. Restará assim, o filtrado que é constituído dos metais que foram adicionados na solução que ficará circulando.

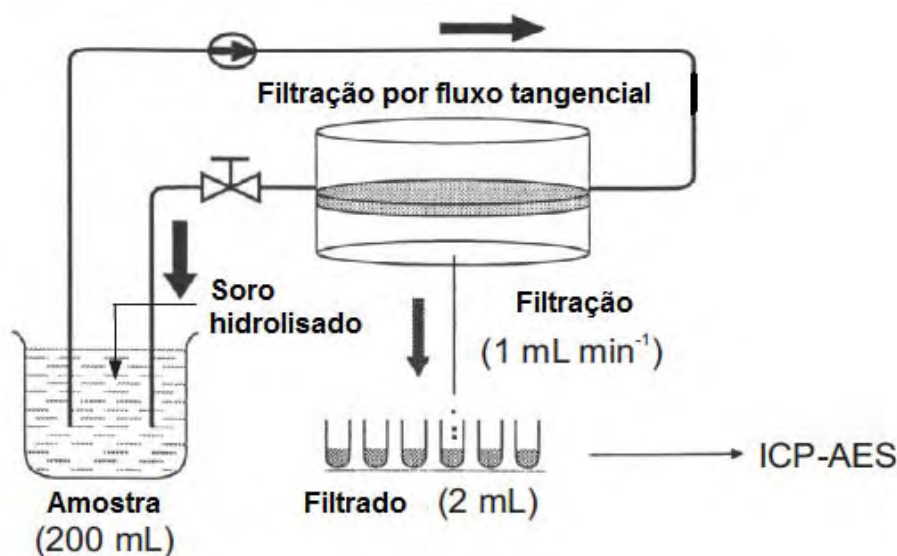
Será feita a adição de uma quantidade conhecida de metal, deixado em contato por 10 minutos para complexar e depois pressionando a pinça de Mohr, será



recolhido o filtrado. Os metais poderão ser determinados por absorção atômica ou plasma. Após a obtenção dos resultados será plotado um gráfico de metal livre em função do metal complexado.

A Figura 44 mostra o esquema da abordagem analítica utilizada para determinar a capacidade de complexação do soro hidrolisado enzimaticamente por metais de interesse.

**Figura 44.** Abordagem analítica para determinar a capacidade de complexação do soro do leite bovino hidrolisado enzimaticamente por metais de interesse



(2) Realizar estudos acerca da viabilidade de testes de suplementação em processos de fermentação alcoólica para microorganismos dependentes de cobre, utilizando para isso os compostos obtidos neste trabalho.

(3) Fazer novas sínteses variando: a razão molar metal ligante; condições reacionais como abaixamento de temperatura, uma vez que o processo é exotérmico e alguns sais precursores de cobre podem hidrolisar sob aquecimento; finalmente mudanças de precursores (utilização de cloreto de cobre(II)), para possivelmente formarmos compostos do tipo  $[Cu(AA)_2]$ . Isso porque, como esse trabalho mostrou, a coordenação do grupo sulfato ao íon de cobre divalente força o ligante a adotar outros modos de coordenação que não exclusivamente o N,O-bidentado-quelante.

(4) Realizar síntese hidrotérmica na tentativa de obter monocristais adequados à resolução estrutural via difração de raios X.

(5) Quanto ao soro do leite, novas enzimas serão testadas a exemplo da tripsina imobilizada em fibra de coco, uma vez que a carboxipeptidase é cara e está em falta.

(6) Analisar os compostos via HPLC (se aparecerem vários picos, conclui-se que são vários compostos e podemos então purificar, isolando os picos).

(7) Analisar os compostos via Espectrometria de Massas para identificar os ligantes envolvidos na complexação.

(8) Analisar os compostos via TG/DTA e UV-Vis

(9) Testar métodos de purificação dos sólidos (recristalização, colunas cromatográficas, etc.).

(10) Realizar experimentos de susceptibilidade magnética a baixa temperatura.

(11) Avaliar a possibilidade de utilização dos compostos obtidos como suplemento de cobre em ração animal, uma vez que, mesmo compostos de cobre(I), não são tóxicos.

(12) Realizar estudos de dissolução/ permeação dos complexos obtidos em cultura de células Caco-2 (extraídas de adenocarcinoma de cólon humano).

## APÊNDICE

Pelo fato dos ligantes (oriundos do hidrolisado enzimático do soro do leite bovino) serem uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos haverá então, a possibilidade de diversas formas de complexação entre os diversos constituintes presentes e conseqüentemente formação de vários compostos.

Algumas propostas serão apresentadas nas Figuras 50, 52 e 54, respaldadas em dados das complexometrias realizadas e nos valores comparados dos espectros vibracionais na região do IV dos compostos obtidos. Nas Figuras 45, 46 e 47 os espectros dos compostos sintetizados tiveram porções destacadas em virtude das interpretações realizadas (seções 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4) e que se mostraram úteis para justificar a maneira pela qual os ligantes utilizados estabeleceram coordenação ao centro metálico.

**Figura 45.** Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuSAA2.

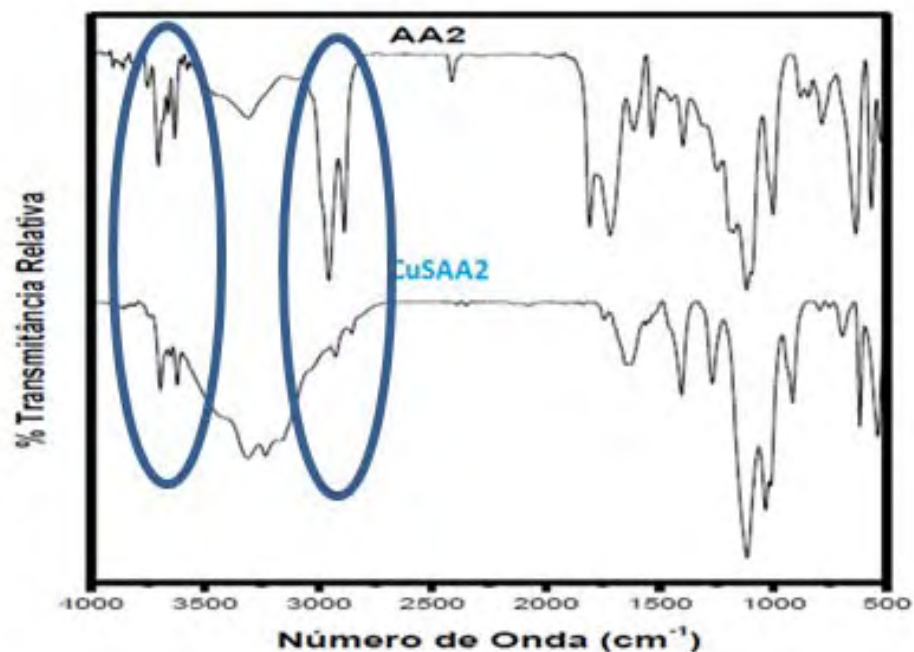


Figura 46. Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuNAA2.

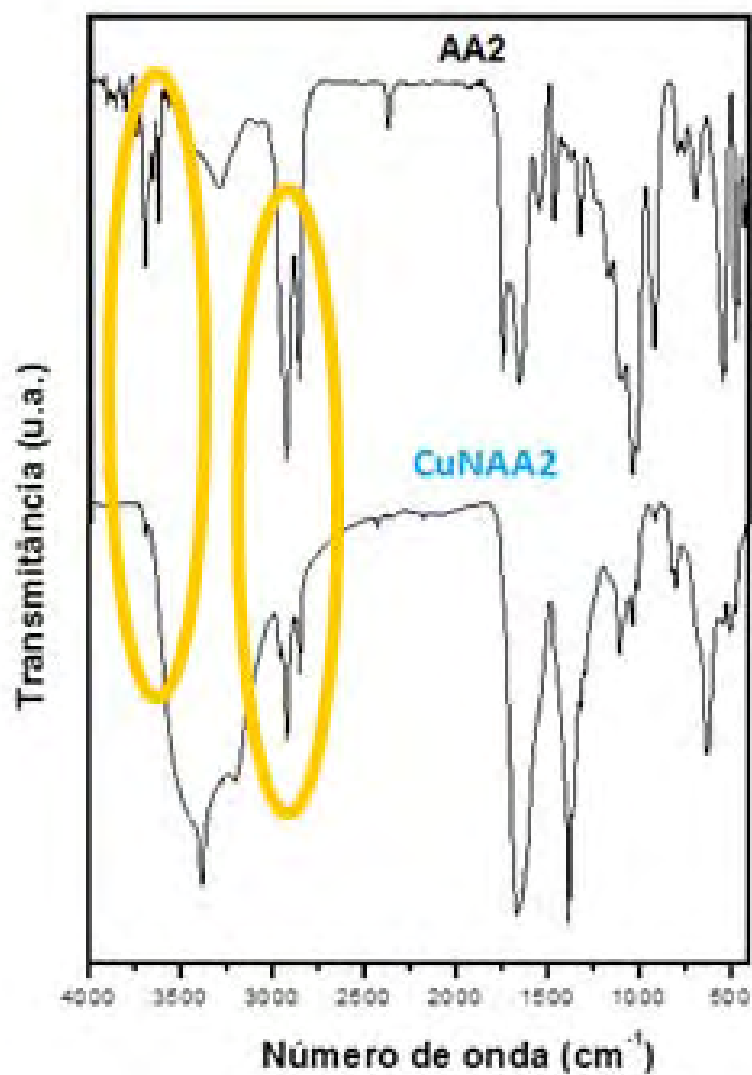
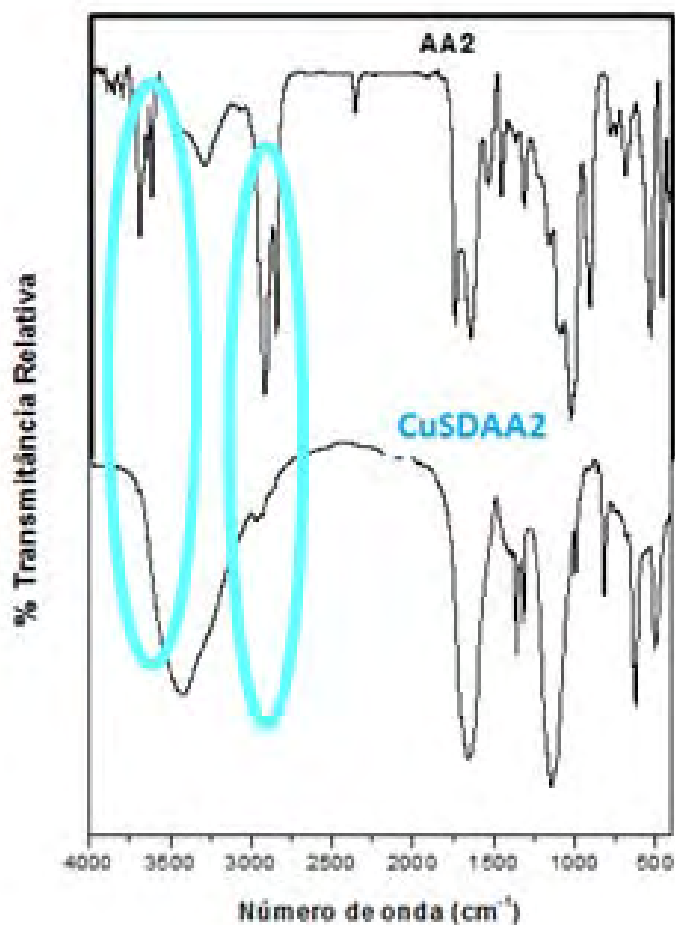
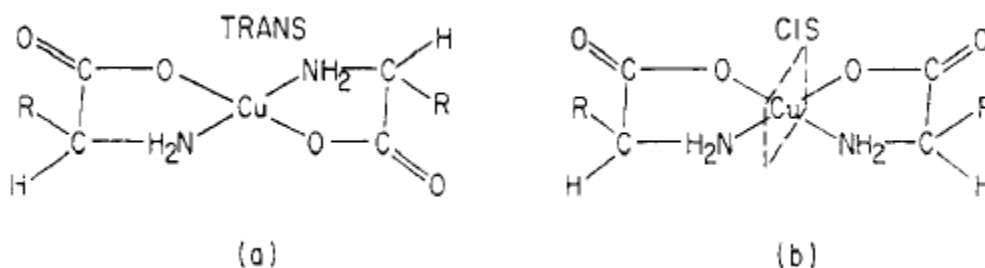


Figura 47. Comparativo entre espectros vibracionais na região do IV do complexo CuSDAA2.



Pelo fato de trataram-se de sistemas complexos, é difícil conhecer a natureza real da esfera de coordenação. Por exemplo, mesmo que houvesse apenas um único aminoácido, poderia haver isomeria *cis-trans* para cobre(II) quadrado planar (Figura 48).

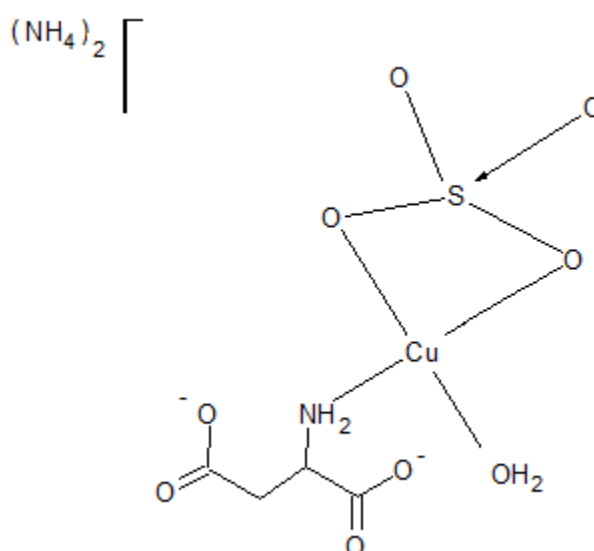
**Figura 48.** Isomeria *cis-trans* para cobre(II) coordenado a um aminoácido genérico, com cobre apresentando geometria quadrado planar <sup>61</sup>.



Sendo assim, apresentamos a seguir proposições estruturais para os três compostos de cobre preparados neste trabalho, levando também em consideração os dados analíticos e espectroscópicos já discutidos nessa Dissertação.

(a) **CuSAA2** - a análise complexométrica resultou em porcentagem de Cu(II) igual a 19,46%, já a proporção teórica, em razão de uma provável fórmula é de 18,43%. Isto sugere que a proximidade de valores é devido à formação de um complexo com estrutura semelhante a representada na Figura 50.

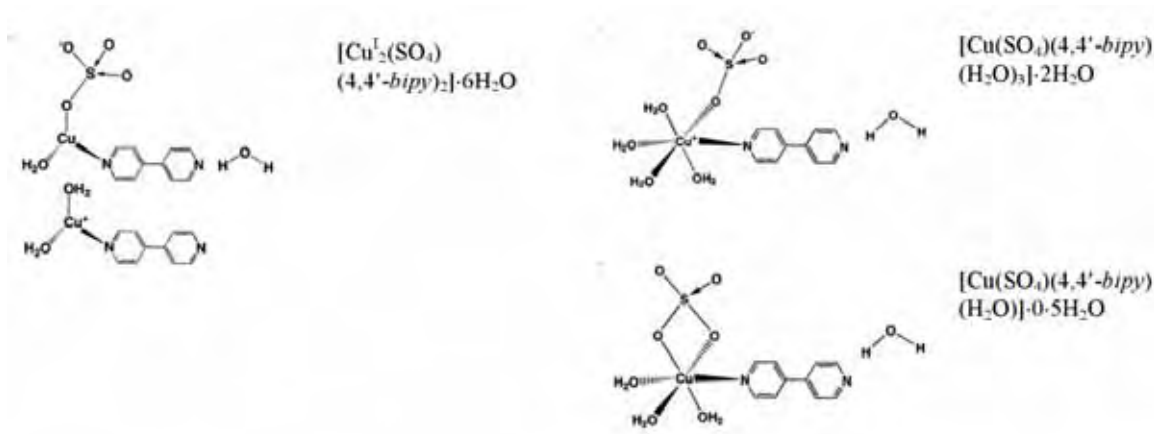
**Figura 49.** Fórmula estrutural proposta para o composto **CuSAA2**, com geometria ao redor do cobre na forma quadrática plana..



Tal proposta leva em consideração as estruturas mostradas por Singh e colaboradores <sup>62</sup>, onde blocos construtores a base de sulfato de cobre são apresentados, representando assim, a possibilidade da espécie iônica sulfato

coordenar-se ao cobre. A Figura 51 representa essa possibilidade para alguns compostos.

**Figura 50.** Compostos organometálicos de cobre com sulfato coordenado <sup>62</sup>.



(4,4'-bipy = 4,4'-bipyridyl)

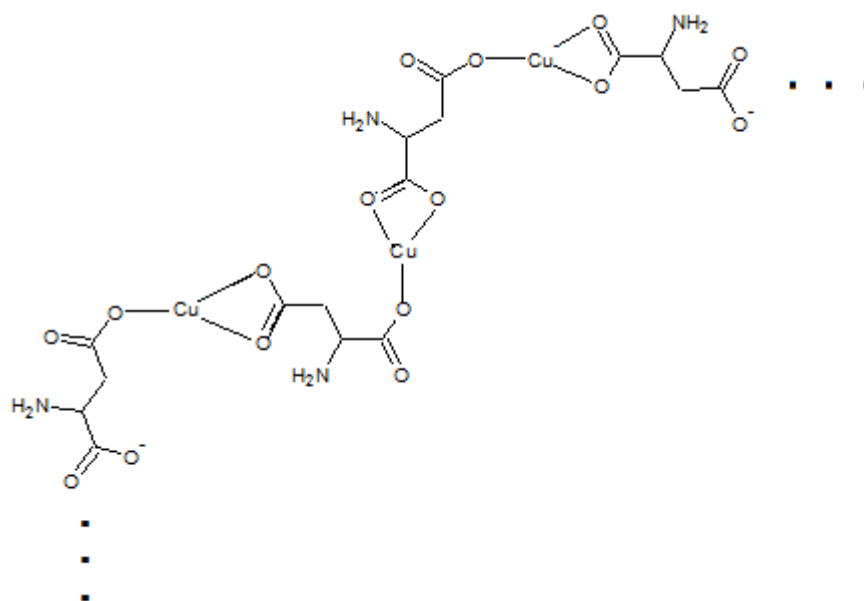
A valência do aminoácido foi considerada como 2- em virtude de aminoácidos dicarboxílicos apresentarem tal comportamento em elevados valores de pH conforme dados da Figura 11.

(b) **CuNAA2** - no que se refere a esse composto, sua cor amarela, não usual para compostos de cobre divalente, bem como sua instabilidade ao oxigênio atmosférico, já sugeria a formação, nesse caso, de um composto de Cu(I). Acreditamos que esse fato pode estar associado à substituição no meio reacional do sulfato de cobre pentahidratado pelo precursor nitrato de cobre(II), favorecendo um processo de redução *in situ*. Quanto à provável composição para este sólido de coordenação, sugere-se a formação do composto de fórmula mínima [CuL], onde L= aminoácido médio. Pode ser que, neste caso, tenha sido formado um polímero de coordenação 1D, a partir da interação entre centros de Cu(I) de geometria trigonal planar e o ligante L coordenado apenas através dos grupos carboxilatos ( como mostrados pelo resultado do infravermelho), via dois modos distintos, bidentado-quelante e monodentado, conforme ilustra a Figura 52.

Os dados da análise complexométrica realizada para esse composto também corroboram com tal proposição, uma vez que a percentagem de cobre esperada

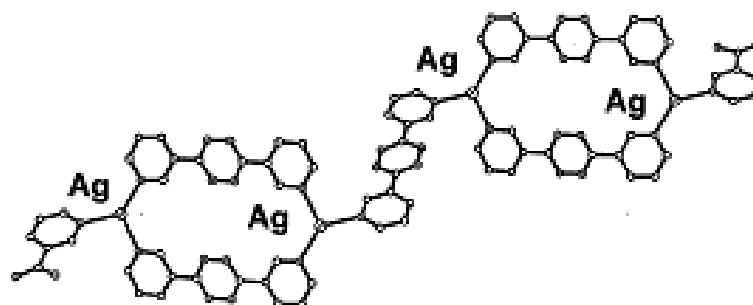
para a espécie  $[\text{CuL}]_n$  é de 32,31%, enquanto o valor obtido experimentalmente foi igual a 34,35%.

**Figura 51.** Fórmula estrutural proposta para o composto **CuNAA2** de composição estequiométrica  $[\text{CuL}]_n$ .

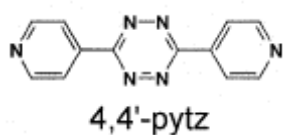


Nos trabalhos de Khlobysto e colaboradores <sup>63</sup> é apresentado o composto  $\{[\text{Ag}_2(3,3'\text{-pytz})_3]^+\}_n$ . Sua estrutura é mostrada na Figura 53.

**Figura 52.** Composto  $\{[\text{Ag}_2(3,3'\text{-pytz})_3]^+\}_n$ .



Onde:



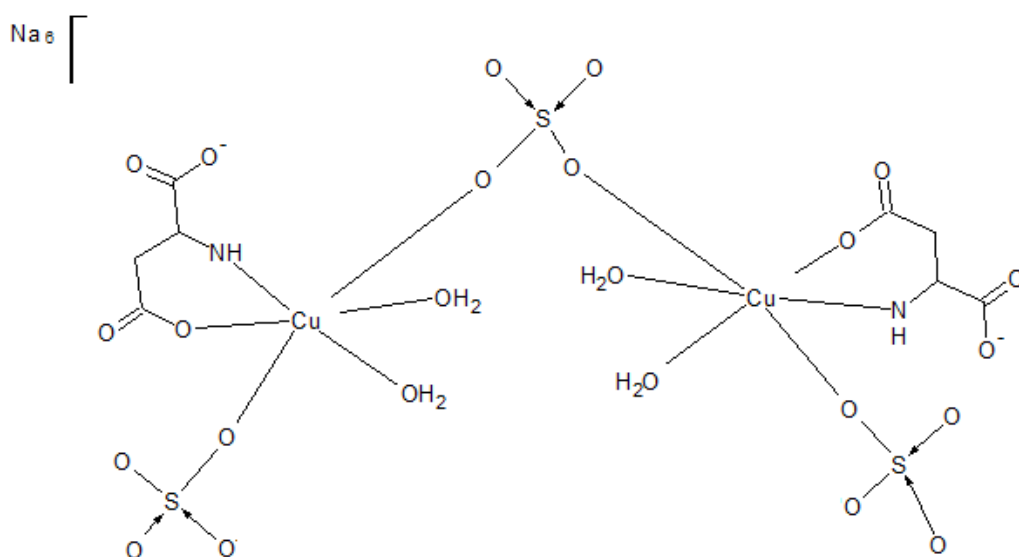


Devido ao fato de Ag(I) e Cu(I) serem sistemas isoeletrônicos provavelmente ambos apresentarão topologias semelhantes. Daí então, a proposta para o composto de Cu(I).

Cabe destacar ainda, que, um trabalho pioneiro publicado em 1912 <sup>64</sup> já mostrava que a interação entre íons cobre(II) e aminoácidos dibásicos (AA) como o aspártico e o glutâmico, presentes no soro do leite aqui sob investigação, conduzia à formação de espécies de fórmula geral [CuAA].

(c) **CuSDAA2** - a porcentagem de metal obtida por complexometria para esse composto é de 14,48%, enquanto que a teórica para a fórmula proposta para este composto (ver Figura 54) é de 14,35%

**Figura 53.** Possibilidade estrutural para o composto binuclear **CuSDAA2**.



Cabe mencionar que quelatos comerciais de cobre(II) contendo aminoácidos, preparados com o mesmo objetivo de suplementação alimentar, apresentam também teor de metal em torno de 10-20% <sup>31</sup>. Sendo assim, em breve, todos compostos obtidos neste trabalho participarão de ensaios zootécnicos.

## REFERÊNCIAS

- 1 HART, E. B. et al. Iron in nutrition: VI. Iron salts and iron-containing ags extracts in the correction of anemia. **J. Biol. Chem.**, v. 77, n. 7, p. 777-795, 1928.
- 2 BARAN, E. J. Trace elements supplementation: recent advances and perspectives. **Mini-Rev. in Med. Chem.**, v. 4, p.1-9, 2004.
- 3 SHOUKRY, A. A. et al. Binary and ternary complexes of copper(II) involving N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamine (Me4en) and various biologically relevant ligands. **J. Sol. Chem.**, v. 35, p. 853-868, 2006.
- 4 TSELEPIS, C. et al. Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin. **Biochem. J.**, v. 427, p. 289-296, 2010.
- 5 SINGH, D. P. et al. Macrocyclic metal complexes derived from 2,6-diaminopyridine and isatin with their antibacterial and spectroscopic studies. **Spectrochim. Acta, Part A.**, v. 76, p. 45-49, 2011.
- 6 EMPRESA BRASILEIRA EM PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Gado de corte:** novos microelementos minerais e minerais quelatados na nutrição de bovinos. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc119/>>. Acesso em: 25 fev. 2012.
- 7 VIEIRA, S. L. Chelated minerals for poultry. **J. Braz. Poultry Sci.**, v. 10, n. 2, p.73-79, 2008.
- 8 SHRIVER, D. F.; ATKINS P. W.; LANGFORD C. H. **Inorganic chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- 9 ALBITECH. **Controle da anemia ferropriva em pré-escolares:** estudo utilizando arroz fortificado com ferro aminoácido quelato. Disponível em: <[http://www.albitech.com.br/artigos\\_4.php](http://www.albitech.com.br/artigos_4.php)>. Acesso em: 25 abr. 2012.
- 10 STANILA, A. et al. Spectroscopic studies of some copper(II) complexes with amino acids. **J. of Mol. Struct.**, v. 834-836, p. 364-368, 2007.
- 11 ESTRADER M. et al. Synthesis, characterization and magnetic properties of six new copper(II) complexes with aminoacids as bridging ligand, exhibiting ferromagnetic coupling. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 361, p. 3963-3969, 2008.
- 12 KRYUKOVA, N. P. et al. Synthesis and study of copper(II) complexes with aspartic acid, serine, and valine. **Russ. J. Gen. Chem.**, v. 75, n. 4, p. 503-506, 2005.
- 13 MASOUD, M. S. et al. Synthesis and characterization of some pyrimidine, purine, amino acid and mixed ligand complexes. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 69, p. 230-238, 2008.

- 14 ONOA, B.; MORENO, V. Nickel(II) and copper(II) – L-cysteine, L-methionine, L-trypto-phan-nucleotide ternary complexes. **Transition Met. Chem.**, v. 23, p. 485-490, 1998.
- 15 FERNANDES, M. C. M. M.; PANIAGO, E. B.; CARVALHO, S. Copper(II) mixed ligands complexes of hydroxamic acids with glycine, histamine and histidine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 5, p. 537-548, 1997.
- 16 NAKAMOTO K. Infrared spectra of aqueous solutions. I. Metal chelate compounds of amino acids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 83, p. 4528-4532, 1961.
- 17 SHYRLIN V.G. et al. Structure, stability, and ligand exchange of copper(II) complexes with oxidized glutathione. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 1335-1346, 2005.
- 18 STONE D. L. et al. Copper amino-acid complexes - towards encapsulated metal centres. **Polyhedron**, v. 23, p. 1709-1717, 2004.
- 19 SAJADI, S. A. A. Metal ion-binding properties of L-glutamic acid and L-aspartic acid, a comparative investigation. **Nat. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 85-90, 2010.
- 20 CARRERA F. et al. Nature of metal binding sites in Cu(II) complexes with histidine and related N-coordinating ligands, as studied by EXAFS. **Inorg. Chem.**, v. 43, n. 21, p. 6674-6683, 2004.
- 21 NOETHIG-LASLO, V.; PAULID, N. Comparative EPR study of copper(II) complexes with threonine derivatives. **Monatsh. Chem.**, v. 128, p. 1101-1108, 1997.
- 22 KORBELY, B. et al. Amino acids and their Cu complexes covalently grafted onto a polystyrene resin: a vibrational spectroscopic study. **J. of Mol. Struct.**, v.348, p. 834-836, n.345, 2007.
- 23 SILVA, M. A. K. R. da. et al. Thermochemistry of some metallic amino acid complexes. Part 1. Copper( II) complexes. **Thermochim. Acta**, v. 205, p. 99-113, 1992.
- 24 LIRA, H. L. et al. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2009.
- 25 GIROTO, J. M.; PAWLOSWSKY, J. O soro do leite e as alternativas para seu beneficiamento. **Brasil Aliment.**, n.10, p. 43-46, set./out. 2001.
- 26 BEM-HASSAN, R. M.; GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potencial reduction. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 47, p. 89-105, 1994.
- 27 KOSIKOWSKI, F. U. Whey utilization and whey products. **J. Dairy Sci.**, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

- 28 SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Braz. J. Food Technol.**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan./mar. 2005.
- 29 HARAGUCHI, F. K. et al. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, v. 19, p. 479-488, jul./ago., 2006.
- 30 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. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 47-55, 2006.
- 31 SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 690-695, 2006.
- 32 SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.
- 33 TEIXEIRA, E. C. et al. The copper resistance genes *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri* gene inactivation results in copper sensitivity. **Microbiol.**, v. 154, p. 402-412, 2008.
- 34 MARQUES, D. P. et al. Separação das proteínas do soro do leite por DEAE-TRISACRYL. **Rev. Alim. Nutr.**, v. 16, n. 1, p. 17-20, jan./ mar. 2005.
- 35 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 36 HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.
- 37 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- 38 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Leite e derivados**. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/>>. Acesso em: 3 jul. 2012.
- 39 McDONALD, C. E.; CHEN, L. L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. **Anal. Biochem.**, v. 10, p. 175-177, 1965.
- 40 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 41 FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **J. Chromatogr. A.**, v. 826, p. 109-134, 1998.
- 42 CAETANO, F. F. **Minerais complexados com hidrolisados enzimáticos parciais de proteína**: otimização das condições de preparação e viabilidade econômica. 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

- 43 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publisher, 2011. p. 1124.
- 44 OLIVEIRA, C. N. et al. Titulação complexométrica de zinco, cobre e cobalto. **Ecl. Quím.**, v. 10, p. 7-10, 1985.
- 45 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.
- 46 MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Rev. Food Sci.**, v. 33, p. 431-476, 1993.
- 47 ZAIA D. A. M. et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.
- 48 SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 431, p. 271-284, 1988.
- 49 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. **J. Anal. Chem.**, v. 55, p. 58-65, 2000.
- 50 ANDREAS, B. The infrared absorption of amino acid side chains. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 74, p. 141-173, 2000.
- 51 STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 142.
- 52 KORBÉLY, B. et al. Amino acids and their Cu complexes covalently grafted onto a polystyrene resin - a vibrational spectroscopy study. **J. Mol. Struct.**, v. 834-836, p. 345-348, 2007.
- 53 VAN OOIJEN, J. A. C. et al. Compressed tetragonal geometry in Cu (II) doped dichlorobis(pyrazole)cadmium. **Chem. Phys. Lett.**, v. 51, n. 2, p. 380-382, 1977.
- 54 CHANDRA, S. et al. Synthesis and spectral studies of transition metal complexes with 5,7,12,14-tetrametil-1,4,8,11-tetraazacyclotetradeca- 4,7,11,14-tetraene, a fourteen membered tetradentate macrocyclic ligand. **React. Inorg. Met.-Org. Chem**, v. 31, n. 7, p. 1205-1215, 2001.
- 55 VAN OOIJEN, J. A. C. et al. Compressed tetragonal geometry in Cu (II) doped dichlorobis(pyrazole)cadmium. **Chem. Phys. Lett.**, v. 51, n. 2, p. 380-382, 1977.

- 56 STAROSTA, R. et al. Structures, electronic properties and solid state luminescence of Cu(I) iodide complexes with 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline and aliphatic aminomethylphosphines or triphenylphosphine. **Dalton Trans.**, v. 40, p. 2459-2468, 2011.
- 57 MORAIS, H. A. et al. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. **ALAN**, v. 52, n. 1, p. 77-83, 2002.
- 58 KLAASSEN, C. D. Metals and heavy metal antagonists. In: MOLINOFF, P. B. et al. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 1649-1671.
- 59 HERZIG, I. et al. Competition between humic substances and  $\alpha$  - aminoacids by metal species. **Veter. Med.**, v. 39, p.175, 1994.
- 60 SANTOS, A. Competition between humic substances and  $\alpha$  - aminoacids by metal species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 3, p. 437-440, 2004.
- 61 HERLINGER, A. W. Infrared spectra of amino acids and their metal complexes: isomerisms in bis (amino acidato) copper complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 92, p. 6674-6681, 1970.
- 62 SINGH, M. et al. Crystallization of copper(II) sulfate based minerals and MOF from solution. **J. Chem. Sci.**, v. 122, n. 5, p. 757-769, 2010.
- 63 KHLOBYSTO, A. N. et al. Supramolecular design of one-dimensional coordination polymers based on silver(I) complexes of aromatic nitrogen-donor ligands. **Coord. Chem.**, v. 222, p. 155-192, 2001.
- 64 KOBER, P. A.; SUGIURA K. The copper complexes of amino-acids, peptides and peptones. **J. Biol. Chem.**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1912.