

UNIVERSIDADE PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**Síntese e atividade biológica de complexos de metais de transição com
hidrolisados proteicos da clara do ovo**

ANA PAULA CARRILLO TRINDADE DE ÁVILA

ARARAQUARA – SP

2013

ANA PAULA CARRILLO TRINDADE DE ÁVILA

**Síntese e atividade biológica de complexos de metais de transição com
hidrolisados proteicos da clara do ovo**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Regina Célia Galvão Frem

ARARAQUARA – SP

2013

Agradecimentos

Creio que o maior agradecimento devo à minha família. Minha mãe Marisete, meu pai Tito e ao meu irmão Leandro; sem eles, sem o seu suporte e amor, nada disso teria sido possível e não me haveria motivação para tal. Há ainda outro membro dessa família, que diríamos não tão humano assim, ao qual devo agradecer e representa muito na minha vida; onde estiver Xiquinho, te amo e muito obrigada.

Em segundo lugar, agradeço ao suporte que me foi dado por todos do Laboratório do Departamento de Química Geral Inorgânica (DQGI) do Instituto de Química Unesp Araraquara, principalmente à minha orientadora Regina Frem e à minha grande companheira de projeto e amiga, Aline Pavan.

Em terceiro lugar, aos meus grandes amigos-irmãos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Taciana Pollo, Paulo Vinícius, Helen Martins, Larissa Almeida e Cíntia Yuka. Tenham certeza de que vocês fizeram suma diferença pra minha vida nesses anos, não apenas para o TCC. Grande parte da minha motivação e do rumo o qual minha vida tomou, devo a vocês; os amo do fundo da minha alma.

Em quarto lugar, porém não menos importante, agradeço aos meus tios Marisa (Tata), Sidnei (Neizico) e Luci, o amor e dedicação de vocês me levaram em frente.

“I usually say the aim of life is to be happy. Our existence is based on hope. Our life is rooted in the opportunity to be happy, not necessarily wealthy, but happy within our own minds. If we only indulge in sensory pleasure, we'll be little different from animals. In fact, we have this marvelous brain and intelligence; we must learn to use it.”

Dalai Lama

Sumário

Resumo	6
1. Introdução	7
1.1 – A clara do ovo como fonte proteica.....	7
1.2 - Quelatos metálicos	10
1.2.1 - Aminoácidos de origem natural como ligantes para formação de quelatos	11
1.3 – Quelatos de Pd(II), Pt(II) e Ag(I).....	12
1.4 - Propriedades antimicrobianas e/ou antitumorais de compostos de Pd(II), Pt(II) e Ag(I).	15
1.5 Ação da Lisozima.....	18
2. Objetivos	19
3. Metodologia.....	19
3.1 - Método de liofilização da clara de ovo.	19
3.2 - Determinação de Proteínas	20
3.3 - Determinação de aminoácidos.....	21
3.4 - Hidrólises	22
3.4.1- Aminograma por CLAE das hidrólises B.....	23
3.5 – Sínteses dos quelatos metálicos.....	25
3.6- Ensaios Biológicos.....	30
3.6.1- Padronização das suspensões bacterianas	30
3.6.2- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras envolvendo o hidrolisado proteico da clara de ovo e os metais.....	30
3.6.3- Leitura com o revelador	31
4. Resultados e Discussão	32
4.1 – Aminogramas por CLAE das hidrólises B.....	32
4.2 – Determinação de Proteínas	35
4.3 – Análise de aminoácidos da clara hidrolisada no equipamento pH-Stat (D)...	36
4.4- Espectroscopia vibracional no IV	37
4.4.1- Clara de ovo <i>in natura</i> e hidrolisada	37
4.4.2- Compostos metálicos	41
4.5 - Análise de aminoácidos na amostra CO-Pd2	54
4.6- Ensaios Biológicos.....	58

4.6.1- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à <i>E. coli</i> ATCC 25922.	58
4.6.2- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	60
5. Conclusões e Perspectivas	62
6. Referências Bibliográficas	64

Resumo

O trabalho trata da síntese e caracterização de quelatos inéditos de prata, paládio e platina contendo proteínas hidrolisadas da clara de ovo. A ideia consiste em preparar e utilizar quelatos metálicos contendo ligantes de origem natural, como metalofármacos.

A pesquisa realizada pode ser dividida em três etapas. A primeira, referente à hidrólise e análise do hidrolisado proteico da clara de ovo. Diversos métodos e condições experimentais foram testadas a fim de se encontrar as condições de hidrólise mais adequadas (natureza da enzima, tempo, pH, temperatura, relação enzima:substrato) para a obtenção de aminoácidos livres e/ou pequenos peptídeos. A segunda parte consistiu na obtenção de compostos de coordenação de platina, prata e paládio contendo o hidrolisado proteico. Nessa etapa, diferentes rotas sintéticas e condições experimentais também foram utilizadas. Além disso, a espectroscopia vibracional no infravermelho foi utilizada nessa etapa para investigar as características estruturais (particularmente, os grupos funcionais presentes) dos compostos metálicos obtidos bem como da matéria prima utilizada (clara de ovo).

Após inúmeras tentativas de síntese, três amostras promissoras, do ponto de vista da Química de Coordenação, foram obtidas, a saber, **CO-Pd₂**, **CO-Pd₉** e **CO-Ag₃**. Ensaio biológicos preliminares, que consistiu na terceira e última parte deste trabalho, foram realizados no sentido de avaliar a capacidade inibitória de crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos metálicos obtidos.

1. Introdução

1.1 – A clara do ovo como fonte proteica

A clara do ovo é relativamente homogênea e a maioria dos solutos presentes é constituída de proteínas. Sua composição consiste em 88,5% de água, 10,5% de proteínas, 0,5% de carboidratos, e o restante consiste de outros solutos¹. As principais proteínas da clara do ovo são ovoalbumina (54%), ovotransferrina (12%), ovomucoide (11%), lisozima (3,5%) e ovomucina (2,5%)².

A clara do ovo é depositada pela glândula tubular em volta do oócito que está se desenvolvendo durante sua passagem pelo ovo ducto, esse processo é seguido pela deposição de casca. Em um ovo típico de uma galinha doméstica, sua clara constitui mais de 58% do volume total e contém cerca de 50% das proteínas totais¹.

A utilização do ovo como material de estudo visa, entre outras coisas, sua fácil disponibilidade e seu baixo custo.

A proposta de trabalhar com o ovo, especificamente com sua clara, parte justamente do fato de nela se encontrar por volta de 50% das proteínas totais contidas em um ovo; a partir disso, pensou-se em como obter pequenos peptídeos ou ainda aminoácidos, para que esses pudessem se complexar com os metais de transição de escolha, no caso os íons paládio(II), platina(II) e prata(I). Os compostos formados a partir da interação entre esses metais e os hidrolisados da clara poderiam então apresentar atividade antimicrobiana e/ou antitumoral.

A interação de íons metálicos com alvos biomoleculares, como por exemplo, aminoácidos, peptídeos, ou proteínas é conhecida por desempenhar importante papel em vários processos biológicos, como nas reações de transferência de elétrons, transporte de oxigênio, bem como transporte de metais e seu armazenamento. Além disso, a inibição de enzimas por ação de metais

complexados a ligantes instáveis é bem conhecida. Essa interação é ainda observada em reações onde ocorre troca de ligantes, nas quais o ligante instável presente no fármaco administrado é substituído pela enzima alvo, princípio usado nas mais importantes metalodrogas. É, por isso, um dos mais importantes processos na Química Bioinorgânica³.

O método utilizado nesse trabalho para que os aminoácidos e/ou peptídeos fossem liberados foi a hidrólise enzimática das proteínas da clara de ovo. Foi realizada, então, uma pesquisa na literatura para que fossem estabelecidos os parâmetros “ideais” para que isso fosse feito como, por exemplo, relação enzima substrato (E:S), pH e temperatura.

Optou-se também por uma hidrólise de clara de ovo previamente liofilizada, a fim de que se comparassem os resultados obtidos de uma hidrólise de clara de ovo *in natura* e liofilizada.

Houve uma colaboração entre o Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP Araraquara e o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas, de forma que foram realizados alguns dos experimentos antes feitos no próprio IQ, porém de forma mais eficiente e precisa. Além disso, foi feita uma parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), mais precisamente com a Profa. Dra. Flávia Maria Netto do DEPAN (Departamento de Alimentos e Nutrição), onde foi realizada a hidrólise das proteínas da clara de ovo em equipamento pHStat.

Através da consulta de artigos científicos, em busca de métodos de hidrólise enzimática da clara do ovo, chegou-se a algumas informações importantes. A papaína, a tripsina e a pepsina se apresentam como as enzimas mais usadas para o

devido fim, além dessas, usa-se ainda a alcalase e a protease microbiana, como exemplificado a seguir.

Em um dos artigos consultados⁴, a papaína é usada em uma relação 3:100 em relação ao substrato, o pH empregado é de 6,0 e a hidrólise se processa a 50°C por 3 horas. Nesse mesmo estudo, a fins comparativos, fez-se hidrólise química (EWPH) utilizando-se HCl 6N, a 110°C por um período de 24 horas. Obtiveram-se vários aminoácidos, sendo aqueles presentes em maior quantidade o Glu, Asp, Ala, Leu e His. Como já era esperado na hidrólise ácida, a quantidade de aminoácidos obtida foi maior, já que há quebra muito mais significativas das ligações peptídicas.

Em outro estudo⁵, a enzima utilizada foi a tripsina bovina (1U/1mg de proteína). O processo ocorreu a 30°C, em um valor de pH igual a 8,3 por um período máximo de 72 horas, tempo no qual se obteve maior quantidade de aminoácidos livres (grau de hidrólise de 55%). Durante todo o processo de degradação da proteína, a concentração de aminoácidos livres aumentou continuamente, atingindo 13,056, 72,800 e 79,557 $\mu\text{mol Gly g}^{-1}$ depois de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Outro artigo científico⁶ que utiliza a clara de ovo em pó lança mão de um conjunto de enzimas para processar a hidrólise: papaína, tripsina e protease microbiana (2:1:2). O experimento ocorre entre 50-60°C a um pH no valor de 7,0, amostras foram retiradas periodicamente, mas o tempo não foi especificado. Os aminoácidos obtidos foram Leu, Phe, Tyr, Ala, Thr, Gly, His e Cys. O emprego de um *pool* de enzimas com diferentes especificidades visou obter maior taxa de conversão de proteínas em produtos de menor peso molecular.

Além desse, outro ensaio enzimático⁷ optou por utilizar mais de uma enzima no processo hidrolítico, trabalhando com alcalase, tripsina e pepsina. Após

experimentos em diferentes pHs, temperaturas e tempo de duração do processo, observou-se que a alcalase (AH) demonstrava ótimo desempenho a 50°C, pH igual a 11,0 e por um tempo de 3 horas, enquanto a tripsina (TH) e a pepsina (PH) em 1 hora, a 37°C e valor de pH igual a 8,5 e 2,0, respectivamente. Não foram especificados, entretanto, os aminoácidos obtidos na hidrólise.

1.2 - Quelatos metálicos

Ligantes polidentados podem produzir *quelatos* (termo derivado do grego que significa *garra*), que são compostos de coordenação nos quais um ligante forma um anel cíclico, em geral de quatro ou cinco membros, com o elemento metálico de transição⁸. Um exemplo de molécula capaz de formar quelatos metálicos é o ligante bidentado etilenodiamina (*en*), $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, que forma um anel de cinco membros quando ambos os átomos de nitrogênio coordenam-se ao mesmo átomo metálico, conforme exemplificado pelo íon-complexo de Cu(II) mostrado na Figura 1.

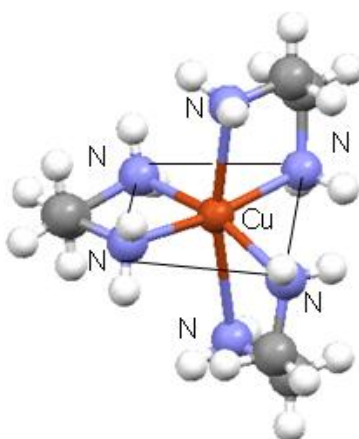


Figura 1. Estrutura do íon-complexo $[\text{Cu}(\text{en})_3]^{2+}$ (*en* = etilenodiamina).

Diversos quelatos têm importância biológica. Como exemplos, podemos citar a hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio no sangue, que contém anéis quelatos formados pelo Fe(II) e o ligante tetradentado porfirina, e a clorofila,

essencial no processo de fotossíntese, que é também um derivado de uma porfirina em que o íon metálico é Mg(II).

1.2.1 - Aminoácidos de origem natural como ligantes para formação de quelatos

As proteínas são polímeros formados pela união de vários aminoácidos, sendo que cada resíduo de aminoácido liga-se a seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (ligação peptídica). As proteínas podem ser reduzidas a seus aminoácidos constituintes, ou seja, podem ser hidrolisadas, por uma variedade de métodos⁹. Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são α -aminoácidos. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono, conforme ilustra a Figura 2. Os aminoácidos diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água¹⁰.



Figura 2. Estrutura geral de um aminoácido.

Os aminoácidos podem se coordenar aos metais de transição como ligantes bi-, tri- ou tetradentados, através dos átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre como doadores de elétrons. A Figura 3 ilustra a estrutura de um quelato metálico contendo aminoácido, onde pode ser observada a formação de dois anéis de cinco membros.

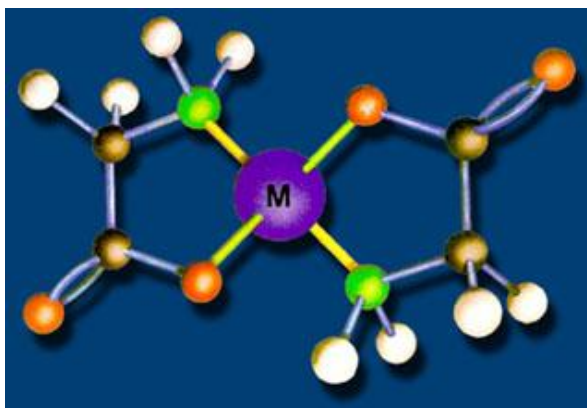


Figura 3. Quelato orgânico contendo dois aminoácidos.

Cabe destacar que tem havido nos últimos anos um resgate do interesse no estudo de complexos de metais de transição contendo aminoácidos como, por exemplo, metionina, lisina, alanina, fenilalanina e triptofano¹¹.

1.3 – Quelatos de Pd(II), Pt(II) e Ag(I)

No que diz respeito aos centros metálicos que deverão ser utilizados nesse projeto, a literatura reporta a preparação de um quelato de paládio(II) com o aminoácido *N*-acetil-L-cisteína, que contém enxofre e está presente em vegetais e frutas (aspargos, pimentões vermelhos, limões, tomates)¹². Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores sintetizou e caracterizou outro quelato de paládio(II) contendo o aminoácido *S*-alil-L-cisteína, um derivado da cisteína¹³.

Com relação ao íon Pt(II), a formação de um anel quelato de cinco membros contendo o aminoácido S-alil-L-cisteína-sulfóxido foi proposta por Corbi *et al.*¹⁴, formando o composto $[\text{PtCl}_2(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S})]$.

Já a interação entre o aminoácido S-metil-L-cisteína e o íon Ag(I) foi estudada por Kasuga *et al.*¹⁵. Neste trabalho foi relatada a formação do polímero Ag(I) S-metil-L-cisteína $[\text{Ag}(\text{L-mecis})]_n$ apresentado na Figura 4, no qual o íon Ag^+ é rodeado por um átomo de enxofre (S1), dois átomos de O (O1' e O2^x) e um átomo de nitrogênio (N1) em uma geometria de coordenação tetraédrica distorcida, pertencente a três diferentes ligantes (mecis)⁻. A coordenação do grupo carboxilato O,O' dos ligantes mecis⁻ está em uma conformação *syn-anti*. Os átomos de N e S estão coordenados ao íon prata(I) em um anel de cinco membros de modo quelatado (Ag1 – N1 – C2 – C3 – S1). Cada ligante (metil)⁻ liga a três átomos de Ag^+ , formando infinitas cadeias poliméricas.

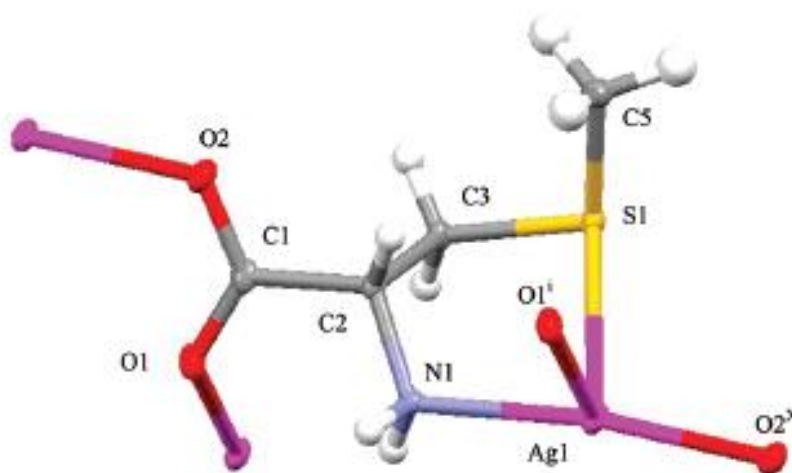


Figura 4. Unidade monomérica do polímero $[\text{Ag}(\text{L-mecis})]_n$ ¹⁵.

Mesmo, aparentemente, não estando envolvidos em sistemas naturais, os íons de prata tem seu uso médico como um importante objetivo. O íon Ag(I) pode ser classificada como um cátion mole de acordo com Pearson e, por isso, prefere se

ligar a ligantes polarizáveis, chamados ligantes moles. Em termos estruturais, a prata é bem parecida com o cobre (Cu), já que os dois têm a mesma configuração eletrônica da camada de valência e uma estrutura de camada fechada ($4d^{10}$). O cobre, como um elemento traço, desempenha importante papel como cofator em todos os organismos. Por causa da estreita relação química entre Ag(I) e Cu(I), não é de se surpreender que a prata também seja reconhecida por se ligar a peptídeos e proteínas.

A teoria que envolve a ligação de Ag(I) com aminoácidos, revela uma tendência comum, constando da ligação de três aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina como sendo as ligações mais fortes com os íons de prata, enquanto que aminoácidos cíclicos apolares (com exceção da metionina) representam a menor afinidade entre a prata e a gama de aminoácidos essenciais. Sendo a mais interessante para um caso clássico de coordenação química, a cisteína não está entre os aminoácidos candidatos a ligante com os íons de prata, apesar da presença de um átomo de enxofre em sua estrutura, o qual representa o grupo mais “mole” presente em proteínas. A cisteína, entretanto, está junto com a metionina, considerada como um sítio preferencial de ligação com os íons de prata em proteínas; suposição não confirmada pela teoria.

A princípio, há três possibilidades de sítios de coordenação presentes em um aminoácido: o nitrogênio doador presente no N-terminal, os átomos de oxigênio do grupo carboxila do C-terminal e, se presente, um heteroátomo composto por cadeias laterais¹⁶.

A Figura 5 representa uma seleção de possíveis modos de coordenação entre Ag(I) e aminoácidos. R representa a cadeia lateral de aminoácidos, enquanto X representa o heteroátomo, presente na cadeia lateral, capaz de se coordenar.

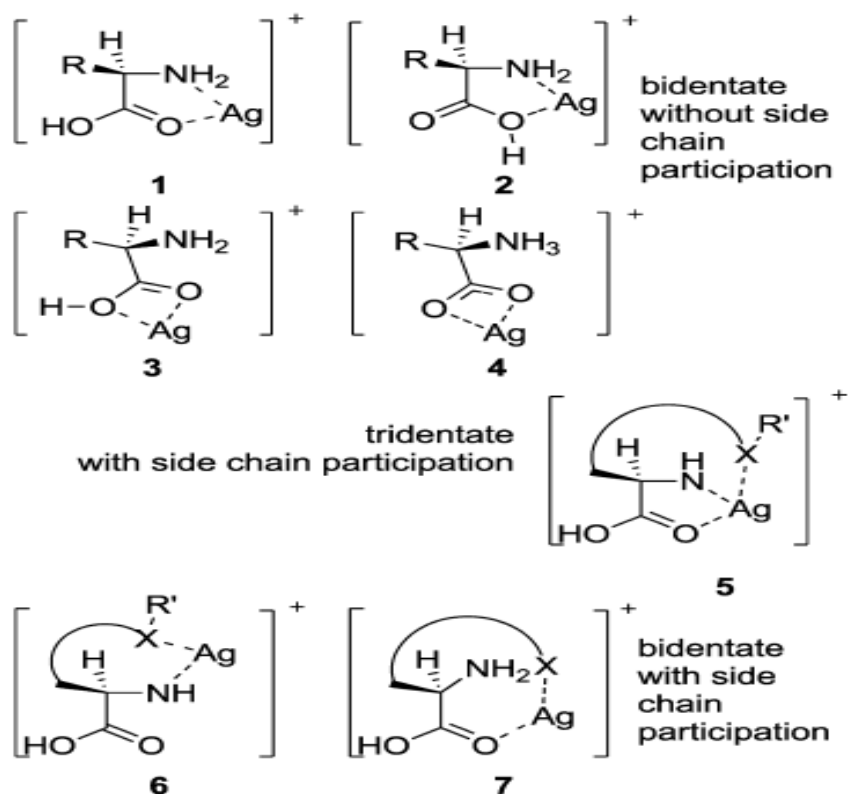


Figura 5. Possíveis modos de coordenação entre prata e aminoácido¹⁶.

1.4 - Propriedades antimicrobianas e/ou antitumorais de compostos de Pd(II), Pt(II) e Ag(I).

É sabido há muito tempo que cátions de prata são altamente tóxicos para as células bacterianas. Nitrato de prata (AgNO₃) demonstra atividade antimicrobiana em mínimas concentrações (CIM 323 µg L⁻¹) contra uma cepa de *E. coli*. Resumidamente, tanto íons de prata quanto nano partículas de prata, são capazes de interagir com a parede celular da bactéria, que é uma das razões para sua atividade antimicrobiana¹⁶.

Em colaboração com o Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, do Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara

- UNESP, fez-se um teste biológico utilizando uma amostra de clara de ovo hidrolisada complexada com íons paládio(II).

Segundo trabalho publicado¹⁷ por esse professor, complexos organometálicos de paládio(II) são extensivamente investigados há décadas e têm encontrado diversas aplicações como em catálise homogênea, química supramolecular, na área tecnológica como materiais líquido-cristalinos, na área médica como agentes anti-tumorais, entre outras. Estes compostos também apresentam uma grande reatividade frente a ligantes orgânicos e inorgânicos originando, assim, espécies com uma rica variedade estrutural. Na química farmacêutica, destacam-se nos últimos anos os derivados do Pd(II), sobre os quais há muitas citações contemplando espécies organopaladadas mono-, bi- e polinucleares com propriedades biológicas.

Por exemplo, o organopaladado contendo o ligante derivado da tiosemicarbazona, $[\text{Pd}(\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S})\text{Cl}_2]$, apresentou atividade citotóxica *in vitro* frente a certos tipos de células cancerosas, sendo a mesma superior àquela do análogo com platina(II). Recentemente, organometálicos de paládio(II) contendo as difosfinas 1,3-bis(difenilfosfina)propano (*dppp*) e 1,4-bis(difenilfosfina)butano (*dppb*), Figura 6, mostraram atividade biológica promissora frente à células cancerosas cultivadas *in vitro*.

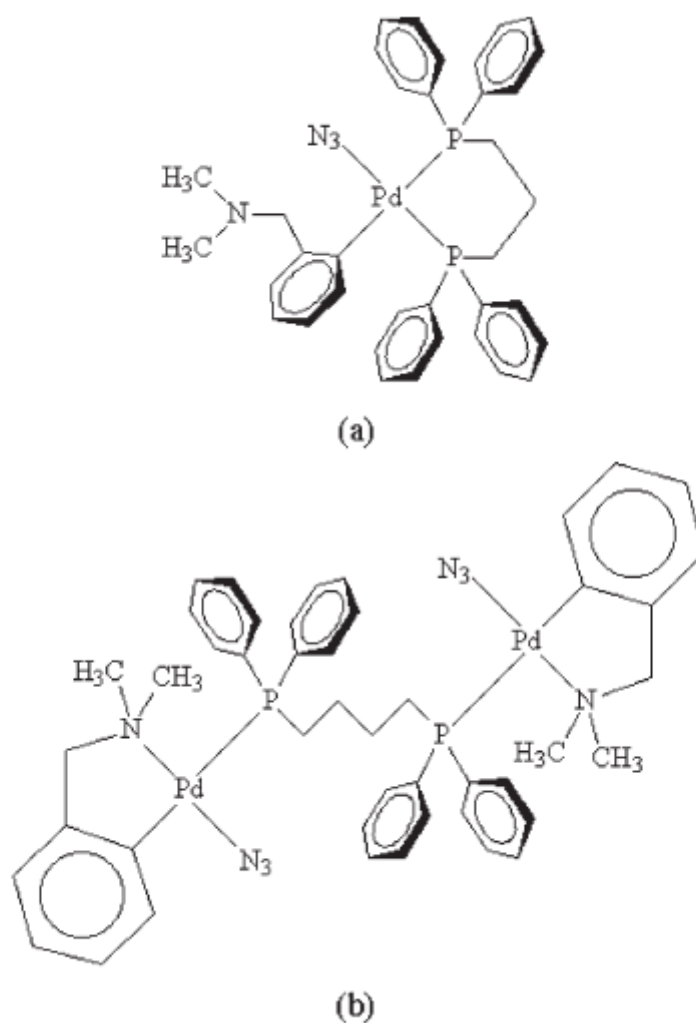


Figura 6. Fórmulas estruturais planas dos organometálicos $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$ (a) e $[\text{Pd}_2(\text{dmmba})_2(\text{N}_3)(\mu\text{-dppb})]$ (b), dmmba= N,Ndimetilbenzilamina, dppp = 1,3-bis(difenilfosfina)propano e dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano¹⁷.

Os resultados mostraram que os referidos compostos podem auxiliar o organismo hospedeiro na resposta imunológica, atuando como organo-comunicadores¹⁷.

Quanto ao uso da platina, há algumas décadas, a cisplatina, *cis*-diaminodictloroplatina(II), vem sendo usada no tratamento de vários tipos de neoplasias, como de pulmão, cabeça, esôfago, estômago, linfomas, melanoma,

osteossarcoma, de mama e cérvix. Por exemplo, em combinação com bleomicina e vimblastina, a cisplatina promove a cura em 80% dos casos de câncer testicular e, em combinação com paclitaxel, prolonga o tempo de vida de pacientes com câncer ovariano em estágio avançado.

A utilização da cisplatina, entretanto, apresenta alguns pontos negativos, como aparecimento de resistência celular, pouca solubilidade em água e efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e toxicidade gastrointestinal.

Acredita-se que muitos dos efeitos adversos observados, principalmente nefrotoxicidade, estejam relacionados com a ocorrência de ligação do complexo de platina com proteínas e peptídeos, como a glutatona, e a consequente acumulação destes adutos no organismo. Sabe-se também que o mecanismo de ação de compostos de platina, em geral, envolve a interação destes com o DNA, configurando-se uma lesão em nível molecular¹⁸.

1.5 Ação da Lisozima

Um trabalho publicado¹⁹ trata justamente do poder proteico da clara de ovo como um potente agente antibacteriano.

O estudo confirmou que a lisozima proveniente da clara de ovo liofilizada (LCO) e seus peptídeos purificados podem mostrar bioatividades multifuncionais. Sendo assim, LCO é uma rica fonte de peptídeos bioativos, os quais podem ser revelados por digestão enzimática.

É notável que o hidrolisado de LCO e seus peptídeos purificados podem ser benéficos como aditivos em alimentos, agentes farmacológicos e nutrientes de uma dieta com papel na prevenção de reações oxidativas.

Os resultados mostraram que esses peptídeos possuem poder inibitório de crescimento tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas. Foram determinadas ainda as concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra *Escherichia coli* e *Leuconostoc mesenteroides*.

2. Objetivos

O trabalho trata do estudo da interação entre os íons metálicos paládio(II), platina(II) e prata(I) com hidrolisados proteicos da clara de ovo. A ideia consiste em preparar quelatos metálicos contendo ligantes de origem natural (aminoácidos/peptídeos da clara de ovo) e investigar sua capacidade de inibição do crescimento de certos microrganismos.

3. Metodologia

3.1 - Método de liofilização da clara de ovo.

O princípio básico da técnica de liofilização é a desidratação sem aquecimento. É esse o diferencial para as outras técnicas como estufas, *Spray-drying*²⁰. A água é eliminada por sublimação. Portanto, a liofilização é uma técnica altamente vantajosa nutricionalmente, visto que grande parte das funções nutricionais e sensoriais é perdida a temperaturas muito elevadas²⁰.

Em um trabalho focado na área de microbiologia de alimentos, mais especificamente, desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência, Rosas *et al*²¹ estudaram a aplicação da técnica de liofilização no

preparo de materiais de referência (MR) destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella spp* em leite.

A importância do estudo tem fundamento na restrita oferta de ensaios de proficiência na área de microbiologia de alimentos. A utilização da liofilização mostrou-se eficaz na produção de materiais de referência (MR) de qualidade e aplicáveis para ensaios de proficiência.

3.2 - Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi feita pelo método de Kjeldahl, no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas. O objetivo é determinar o teor de nitrogênio total para o cálculo do teor de proteína em alimentos e matérias-primas alimentares.

Princípio do método - A amostra é digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, na presença de catalisadores, transformando todo o nitrogênio presente na amostra em sulfato de amônio. Em um sistema fechado, o sulfato de amônio é convertido em amônia gasosa após a alcalinização do meio com solução de hidróxido de sódio concentrada. A amônia é destilada e recolhida em solução de ácido bórico contendo indicador ácido-base. O teor de nitrogênio é calculado a partir do volume e da concentração de uma solução de ácido clorídrico padronizada, utilizada para a titulação da amônia, que é recolhida em ácido bórico. O teor de proteína da amostra é calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio total por um fator específico do produto ou genérico para proteínas, em geral 6,25.

Execução do ensaio - Pesou-se por volta de 0,6g de clara de ovo crua, em duplicata, adicionou-se de 5,0 a 6,0g de uma mistura catalisadora em cada um dos

tubos. Na capela, com óculos de proteção e luvas, adicionou-se 20 a 25 mL de ácido sulfúrico concentrado nos tubos de digestão e em seguida, foram colocados no bloco digestor a 150°C, por 30 minutos. Seguiu-se com a destilação e titulou-se o destilado recolhido no erlenmeyer com a solução de HCl padronizada (0,1 mol L⁻¹), até o ponto de viragem (a fenolftaleína foi utilizada como indicador uma vez que o borato de amônio formado é básico).

3.3 - Determinação de aminoácidos

A análise de aminoácidos totais e livres, feita também no ITAL em Campinas, foi realizada por cromatografia em coluna de fase reversa em cromatógrafo líquido de alta eficiência com derivatização pré-coluna com fenil isotiocianato. Para os aminoácidos totais, foi realizada hidrólise ácida com fenol onde ocorre a liberação dos aminoácidos individuais. Esse procedimento permite a recuperação da maioria dos aminoácidos, com exceção do triptofano e dos aminoácidos sulfurados (metionina, cistina e cisteína), que são completamente destruídos e devem ser analisados por outro método. Aos aminoácidos liberados na hidrólise ácida é adicionado o ácido α -aminobutírico como padrão interno.

Após a eliminação do ácido por evaporação a vácuo, é realizada uma re-evaporação com solução de acetato de sódio, metanol e trietilamina. Após este procedimento, é realizada a derivatização do hidrolisado com solução de metanol, água ultrapura, trietilamina e fenilisotiocianato (PITC). Os aminoácidos são dissolvidos em diluente e são introduzidos na coluna. A fase móvel consiste dos eluentes A e B. Os eluentes com pH 6,60 contêm acetato de sódio, acetonitrila, água ultrapura, EDTA dissódico. As áreas dos picos obtidos a partir da amostra desconhecida são quantificadas em comparação com as de uma mistura padrão de

aminoácidos e padrão interno a 254 nm. Para os aminoácidos livres, são realizadas as etapas de extração e desproteinização em HCL 0,1M e metanol 99%, respectivamente. Os processos de secagem e derivatização são os mesmos utilizados para os aminoácidos totais.

3.4 - Hidrólises

Hidrólise Enzimática – Hidrólise B

Os ensaios para a realização das hidrólises da clara de ovo deste trabalho foram baseados em um método descrito na literatura²². O trabalho constava da utilização da pancreatina, em concentrações diferentes (relação enzima: substrato) e tempos variados. Como resultado, o artigo mostrou que havia três melhores tempos e relações enzima: substrato, de acordo com a quantidade de aminoácidos obtidos.

Foram escolhidas, então, as variáveis com as quais se trabalhariam, extrapolando os resultados obtidos com o leite, para a clara de ovo. Para cada tríade, utilizou-se clara de ovo crua e também previamente liofilizada. A Tabela 1 ilustra as variáveis utilizadas em cada experimento.

Tabela 1. Planejamentos das hidrólises iniciais.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Relação E:S	4:100	4:100	1:100
Temperatura(°C)	50	50	50
Tempo (h)	5	10	15

3.4.1- Aminograma por CLAE das hidrólises B.

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

Esses resultados (Figuras 7-9) mostraram que o melhor tempo para fazer a hidrólise era 5 horas, já que nesse tempo se obtiveram as maiores quantidades de aminoácidos e/ou peptídeos, e a sucessão das horas não fez significativa diferença na obtenção dos mesmos, em uma relação de enzima substrato de 4% (4:100).

A partir desse ponto então começou a se fazer apenas hidrólises de 5 horas, respeitando a concentração ideal da enzima para esses experimentos (4%).

Consultando uma colaboradora do trabalho, Dr. Maria Teresa Bertoldo do Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL) em Campinas, nos foi sugerido que utilizássemos azida sódica como um agente conservante, em concentração de 0,05%, já que em muitas ocasiões, era observada a presença de fungos no material não liofilizado.

Sendo assim, os novos experimentos foram feitos fixando um tempo de 5 horas, usando a pancreatina como enzima, e variando a relação enzima:substrato. A

temperatura esteve por volta de 50°C e o pH em 7,5. Foram utilizadas duas claras de ovos por experimento, cerca de 60g. Adicionou-se ainda a azida sódica 0,05%. A Tabela 2 mostra o esquema utilizado no planejamento das hidrólises.

Tabela 2. Variação da relação enzima substrato (E:S) na hidrólise enzimática.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Relação E:S	1:100	1:50	1:25

Hidrólise Enzimática – Hidrólise C

A partir dos resultados obtidos nas séries de hidrólises feitas previamente, em diferentes concentrações e tempos de reação, escolheu-se a hidrólise feita no tempo de 5 horas, já que nos mostrou melhores resultados quanto à presença de pequenos peptídeos ou aminoácidos.

Tendo em vista que o ovo possui em média 10,5% de proteínas, utilizou-se um equivalente a 320mL de clara de ovo (dez ovos), contendo portanto, aproximadamente 33,6mL (ou 35,77g) de proteínas nessa amostra.

A enzima utilizada foi a pancreatina, e segundo a literatura [22] utiliza-se entre 2 a 4% dessa enzima. Optou-se por utilizar 3% de pancreatina, ou seja, 1,07g.

Além disso, utilizou-se também azida sódica (0,05%) como conservante, a fim de evitar contaminação por microrganismos, garantindo a preservação das amostras.

A hidrólise foi feita sob agitação e temperatura controladas, em banho de óleo, entre 40 e 45°C. O pH foi ajustado, utilizando-se uma solução de HCl e manteve-se entre 8,8 e 9,0 durante as 5 horas de hidrólise, sendo que a pancreatina só foi adicionada depois que atingida a temperatura ideal de funcionamento da mesma (por volta de 40°C). A hidrólise foi interrompida aumentando-se drasticamente a temperatura, inativando a enzima.

Hidrólise Enzimática – Hidrólise D

Uma terceira hidrólise foi feita em parceria com o Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Utilizamos os mesmos parâmetros da segunda hidrólise, pancreatina (4% da massa total de clara de ovo), sendo utilizados 70 mL de clara de ovo e 2,8 g de pancreatina, pH 9, 50°C, durante 5 horas (300 minutos). A diferença, dessa vez, é que não utilizamos um aquecedor com agitação e controle manual do pH, pudemos experimentar o funcionamento de um equipamento com esse fim, pH Stat - Titulador Automático modelo DL 21 Gfix (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suíça), com sistema de agitação e aquecimento por meio de acoplamento com banho termostático.

3.5 – Sínteses dos quelatos metálicos

Sínteses dos quelatos metálicos (Pd, Pt, Ag)

Os compostos foram obtidos, via reações convencionais e síntese hidrotérmica, usando como precursores metálicos os complexos $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ [e $[\text{H}_2\text{PtCl}_4]$], além do nitrato de prata como fonte de íons Ag(I) , e os hidrolisados

proteicos da clara de ovo. As condições reacionais como temperatura, pH, solventes e estequiometria dos reagentes foram alteradas, visando obter as melhores rotas sintéticas para obtenção dos compostos.

A fim de se observar a formação de complexos e/ou quelatos metálicos entre os metais de transição em questão (paládio, platina e prata) e o hidrolisado proteico da clara de ovo, realizaram-se algumas sínteses.

Foram utilizadas clara crua e hidrolisada (em diferentes condições de tempo e relação E:S) com os metais, platina, prata e paládio. A relação utilizada foi de 5mL de clara de ovo para 0,0130 g do metal (Pt, Pd ou Ag), ou então dobraram-se essas quantidades para se obter maior quantidade de amostra (0,0260g do metal para 10 mL de clara de ovo).

A síntese consistiu em diluir no mínimo de água possível a massa pesada de cada precursor metálico em um béquer. A outro béquer contendo a clara de ovo, que já estava sob agitação, adicionou-se então a solução com o precursor do metal sobre a clara de ovo, de forma lenta. Deixou-se a reação ocorrer por tempo de uma hora, observando-se a formação de precipitados, mudança de cor e alteração de pH.

Seguiu-se então para centrifugação e/ou filtração, dependendo do aspecto da amostrada obtida. Todo o material obtido foi guardado, ou seja, tanto as soluções quanto os precipitados. Os precipitados foram colhidos e deixados para secar em papel de filtro. As soluções também foram deixadas para secar, em condições ambientes ou dentro de capelas, na tentativa de formação de monocristais.

Detalhes experimentais passam a ser descritos a seguir, sendo que nas siglas utilizadas para nomear as diferentes sínteses, CO é clara de ovo, Pd/Pt/Ag representam os precursores de metais utilizados e o número identifica a síntese.

Amostra CO – Pd2

Em um béquer de aproximadamente 200mL, em agitação e à temperatura ambiente, adicionou-se uma solução contendo 0,0130g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ e 5 mL de etanol à 5mL de clara de ovo que foi hidrolisada por cinco horas (**Hidrólise B**).

Imediatamente após a adição da solução de metal ao hidrolisado, a solução resultante apresentou aspecto de espuma, de coloração amarelo intenso. Devido a essa consistência, não foi possível a filtração, sendo assim, deixou-se o béquer em temperatura ambiente para evaporação do solvente. O material seco foi enviado para análises.

As amostras descritas a seguir foram preparadas seguindo o mesmo procedimento: solubilização de 0,0130g dos precursores em 4mL de água destilada, e a posterior adição dessa solução à 5mL do hidrolisado obtido na **Hidrólise C**.

Amostra CO-Pd7

Precursor: $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$

Após uma hora de agitação, por não haver formação de precipitado, deixou-se o béquer na capela para secagem do solvente durante 24 horas. Houve a formação de uma “placa” amarelo claro no fundo do béquer, que foi quebrada e triturada até a formação de um pó. Esse pó foi enviado para análises.

Amostra CO – Pt2

Precursor: Hexacloroplatinato (PtCl_6)

Após uma hora de agitação, a solução apresentou-se amarelo claro e, por não haver formação de precipitado, deixou-se o béquer na capela para secagem do solvente durante 24 horas. Houve a formação de uma “placa” amarelo claro no fundo do béquer, que foi quebrada e triturada até a formação de um pó. Esse pó foi enviado para análises.

Amostra CO – Ag3

Precursor: AgNO_3

Após uma hora de agitação, por não haver formação de precipitado, deixou-se o béquer na capela para secagem do solvente durante 24 horas. Houve a formação de uma “placa” vermelho amarronzada no fundo do béquer, que foi quebrada e triturada até a formação de um pó. Esse pó foi enviado para análises.

Amostra CO – Pd9

Em um béquer de aproximadamente 200mL, em agitação e à temperatura ambiente, adicionou-se uma solução contendo 0,0130g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ e água suficiente para solubilização em 5mL da **Hidrólise D**.

Após uma hora de agitação, por não haver formação de precipitado, deixou-se em capela para secagem do solvente por 24 horas. Houve a formação de um “filme” amarelo que ficou depositado no fundo do béquer. O material foi enviado para análise.

As duas sínteses a seguir foram realizadas seguindo o mesmo procedimento, sendo este, a solubilização de 0,0130g dos precursores em, aproximadamente 4mL de água destilada, e a posterior adição dessa solução à 5mL da **clara *in natura*** (sem sofrer hidrólise).

Amostra CO – Pd8

Precursor: $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$

Após uma hora de agitação, por não haver formação de precipitado, deixou-se o béquer na capela para secagem do solvente durante 24 horas. Houve a formação de uma “placa” amarelo claro no fundo do béquer, que foi quebrada e triturada até a formação de um pó. Esse pó foi enviado para análises.

Amostra CO – Pt1

Precursor: Hexacloroplatinato (PtCl_6)

Após uma hora de agitação, por não haver formação de precipitado, deixou-se o béquer na capela para secagem do solvente durante 24 horas. Houve a formação de uma “placa” amarelo claro no fundo do béquer, que foi quebrada e triturada até a formação de um pó. Esse pó foi enviado para análises.

Os precipitados e/ou soluções obtidos foram analisados via espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Os espectros no IV foram obtidos usando amostras na forma de pastilhas de KBr, utilizando o espectrofotômetro NICOLET IMPACT 400 ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$).

3.6- Ensaios Biológicos

Foram realizados ensaios biológicos em parceria com o Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Profa. Dra. Taís Maria Bauabe (UNESP – Araraquara), o qual consistiu na escolha de dois microrganismos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, a primeira uma bactéria Gram negativa e a segunda Gram positiva. Os testes realizados envolveram a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), tanto para os complexos entre o ligante biológico e os metais, quanto para somente os sais ou precursores metálicos (Pd, Pt e Ag). Além disso, também foram realizados testes para a clara de ovo *in natura* e hidrolisada.

3.6.1- Padronização das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH (Caldo Müeller-Hinton), adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC (unidade formadora de colônia)/mL). Em seguida, foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (UFC = Unidade Formadora de Colônia).

3.6.2- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras envolvendo o hidrolisado proteico da clara de ovo e os metais.

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical

and Laboratory Standards Institute²³. Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80µL de CMH. Em seguida foram acrescentados 100µL do complexo (metal + clara de ovo) solubilizado em água estéril, e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a ampicilina, esta foi usada em concentração adequada para cada microrganismo, visando alcançar a CIM, sendo considerada como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas²⁴. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle da clara de ovo e o controle negativo (solventes). As microplacas foram encubadas em estufa microbiológica à temperatura de 37° C durante 24 horas.

3.6.3- Leitura com o revelador

Foram realizadas leituras com o revelador resorufina (100µg/mL) onde 30µL foram adicionados em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas, a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano²⁵.

A resazurina (7-hidróxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos²⁶.

4. Resultados e Discussão

4.1 – Aminogramas por CLAE das hidrólises B

Os aminogramas apresentados nas Figuras 7-9, bem como suas respectivas tabelas (Tabelas 3-5), são resultados das hidrólises iniciais **B** e mostram a extensão das mesmas de acordo com a variação de tempo (5,10 e 15 horas).

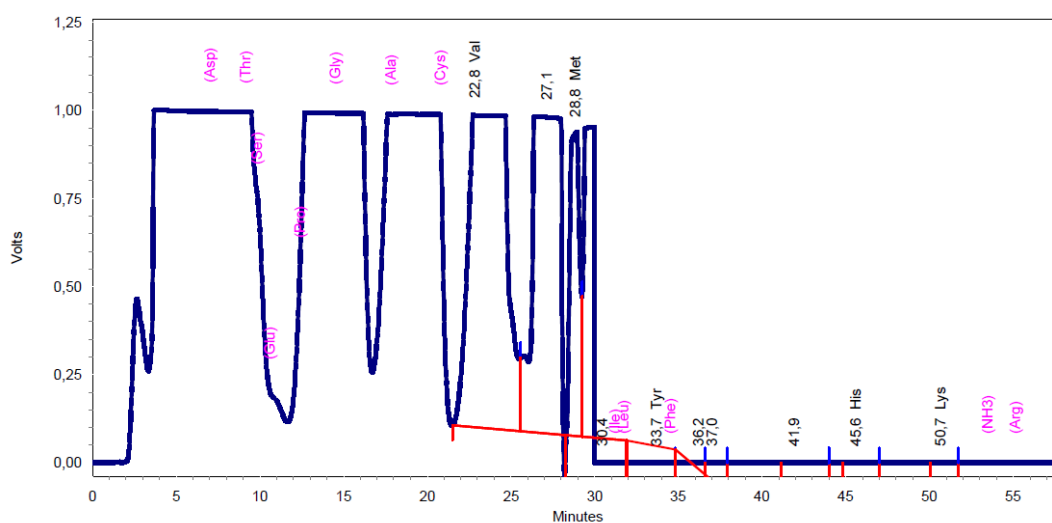


Figura 7. Aminograma obtido via CLAE de clara *in natura* hidrolisada por 5 horas e relação E:S de 4:100 (Hidrólise B).

Tabela 3. Tempos de retenção e concentração dos aminoácidos observados no experimento.

minutes					
Fluorescência (Ex:350nm, Em:450nm)					
Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Val	22,833	140232610	3332,200	42084,09
2		27,117	96931119	0,000	0,00
3	Met	28,836	37149425	347,867	106792,12
4		30,423	75616770	0,000	0,00
5	Tyr	33,686	17157146	0,000	76285,29
6		36,200	15766759	0,000	0,00
7		36,994	14322959	0,000	0,00
8		41,916	87384788	0,000	0,00
9	His	45,584	46744572	1739,790	26867,94
10	Lys	50,665	54081520	626,106	86377,57
11		59,105	20425516	0,000	0,00
12		60,517	18566257	0,000	0,00
Totals			624379442	6045,962	

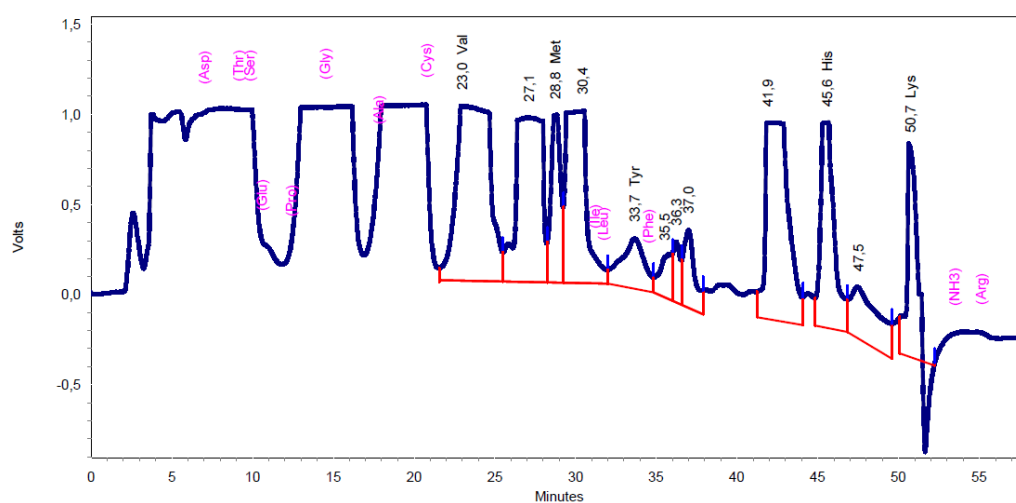


Figura 8. Aminograma obtido via CLAE de clara *in natura* hidrolisada por 10 horas e relação E:S de 4:100 (Hidrólise B).

Tabela 4. Tempos de retenção e concentração dos aminoácidos observados no experimento.

Fluorescência (Ex:350nm, Em:450nm)					
Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor
1	Val	22,999	130601919	3103,356	42084,09
2		27,117	96800170	0,000	0,00
3	Met	28,756	35156484	329,205	106792,12
4		30,418	75317135	0,000	0,00
5	Tyr	33,658	14202434	0,000	76285,29
6		35,538	5543724	0,000	0,00
7		36,250	5369551	0,000	0,00
8		36,996	10267426	0,000	0,00
9	His	41,917	84663132	0,000	0,00
10		45,584	47323466	1761,336	26867,94
11		47,518	10772132	0,000	0,00
12	Lys	50,741	53449764	618,792	86377,57
13		59,158	16536904	0,000	0,00
14		60,515	18838488	0,000	0,00
Totals			604842728	5812,689	

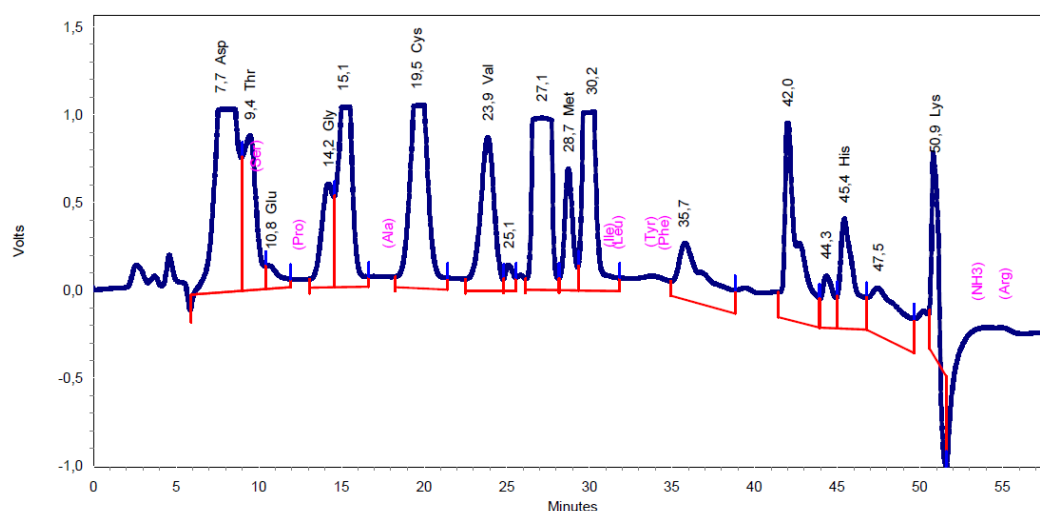


Figura 9. Aminograma obtido via CLAE de clara *in natura* hidrolisada por 15 horas e relação E:S de 1:100 (Hidrólise B).

Tabela 5. Tempos de retenção e concentração dos aminoácidos observados no experimento.

Fluorescência (Ex:350nm, Em:450nm)						
Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Response Factor	
1	Asp	7,689	104631385	2673,381	39138,22	
2	Thr	9,446	44131615	680,105	64889,43	
3	Glu	10,750	3654501	149,470	24449,68	
4	Gly	14,217	25704196	0,000	48283,14	
5		15,083	59240507	0,000	0,00	
6	Cys	19,541	72930739	1377,608	52940,11	
7	Val	23,858	44367068	1054,248	42084,09	
8		25,138	2884734	0,000	0,00	
9		27,117	74632352	0,000	0,00	
10	Met	28,730	19982761	187,118	106792,12	
11		30,169	54396049	0,000	0,00	
12		35,707	11919229	0,000	0,00	
13		42,009	40099098	0,000	0,00	
14		44,334	4845399	0,000	0,00	
15	His	45,424	18218737	678,085	26867,94	
16		47,501	10839135	0,000	0,00	
17	Lys	50,915	32812108	379,868	86377,57	
18		59,096	23386838	0,000	0,00	
19		60,507	18928514	0,000	0,00	
Totals			667604965	7179,884		

Na realização dessas hidrólises foi utilizada a pancreatina. Os resultados dos aminogramas mostram que a hidrólise ocorreu, uma vez que há o aparecimento de aminoácidos livres. Escolheu-se a hidrólise de 5 horas, já que a mesma mostrou, além de um tempo menor, maior concentração total de aminoácidos em relação à de 10 horas e, mesmo tendo menor concentração de aminoácidos que a de 15 horas, a praticidade nos experimentos foi levada em conta também.

4.2 – Determinação de Proteínas

A determinação do teor de proteínas nos substratos foi realizada usando a seguinte equação:

$$\text{Nitrogênio total: } NT = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

Onde: NT= nitrogênio total; V_a = volume de HCl da amostra (mL); V_b = volume de HCl do branco (mL); N= concentração do HCl (normalidade); m= massa da amostra (g ou mL).

Proteína: **P= NT x Fator**

Onde: P= teor de proteína na amostra; Fator= segundo a tabela (para mistura animal e vegetal é 6,25).

A Tabela 6 ilustra os resultados obtidos, em duplicata, na determinação da quantidade percentual de proteína presente na clara de ovo *in natura*.

Tabela 6. Quantidade de proteína presente na clara de ovo *in natura*.

Massa(g)	Va(mL)	Vb(mL)	%Nitrogênio	Média	%Proteína	Média
0,6105	11,80	0,00	1,8533	1,82	11,5833	11,40
0,6063	11,35	0,00	1,7950		11,2187	

Através da tabela pode-se concluir que a clara de ovo utilizada nas sínteses possui uma média de 11,40% de conteúdo proteico, resultado este que se encontra de acordo com a literatura¹ que mostra valores de proteínas entre 10 e 12%.

4.3 – Análise de aminoácidos da clara hidrolisada no equipamento pH-Stat (D).

Da colaboração feita com o DEPAN na Unicamp, realizamos a hidrólise da clara de ovo em pHStat. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos nessa hidrólise, feita por 5 horas, em pH 8,0 e 50°C e com uma relação enzima substrato de 4% da massa total de clara de ovo (70mL), ou seja, 2,8g de pancreatina.

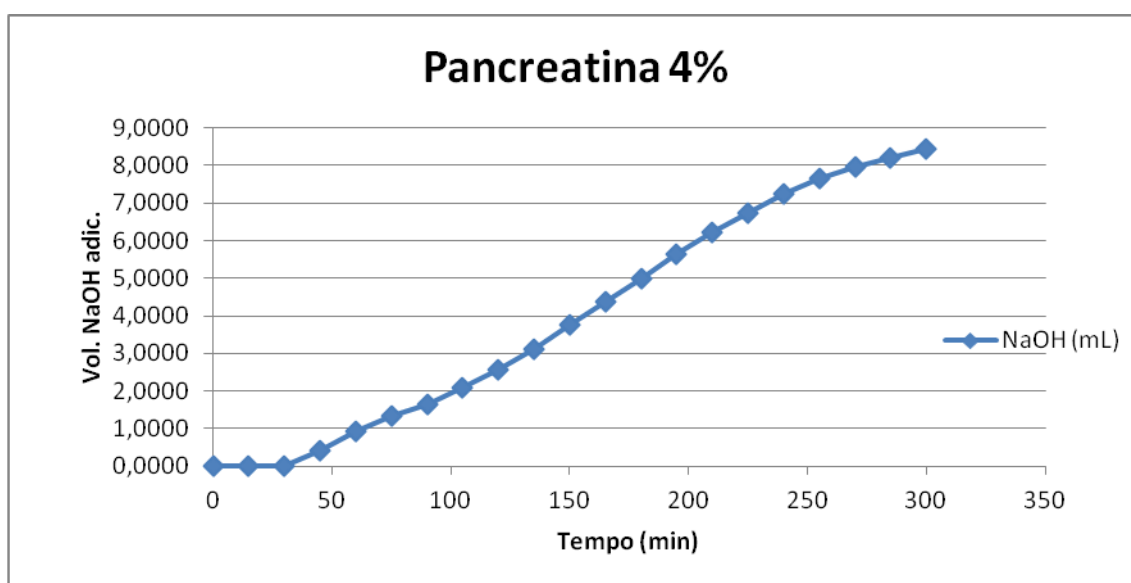


Figura 10. Gráfico da hidrólise de clara de ovo, relacionando volume de NaOH gasto e tempo da reação.

Como durante o processo de hidrólise, há liberação de ácido, diminuindo o pH da amostra, optou-se por realizá-la no equipamento pHStat que permite adicionar automaticamente uma base (nesse caso, NaOH 1 mol/L) para manter constante o pH programado (pH=8,0). Entretanto, não se levou em conta um fator importante na hora de programar a hidrólise, o de que o pH inicial da clara de ovo é em torno de 9, o que significa que a hidrólise já estava acontecendo antes do pH 8 ser atingido, porém nenhum volume de base havia sido adicionado ainda, impedindo o cálculo do Grau de Hidrólise (GH) do experimento.

4.4- Espectroscopia vibracional no IV

4.4.1- Clara de ovo *in natura* e hidrolisada

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (IV) obtidos para a clara de ovo *in natura* e clara de ovo hidrolisada estão ilustrados nas Figuras 11 e 12, enquanto as atribuições das bandas observadas estão compiladas na Tabela 7.

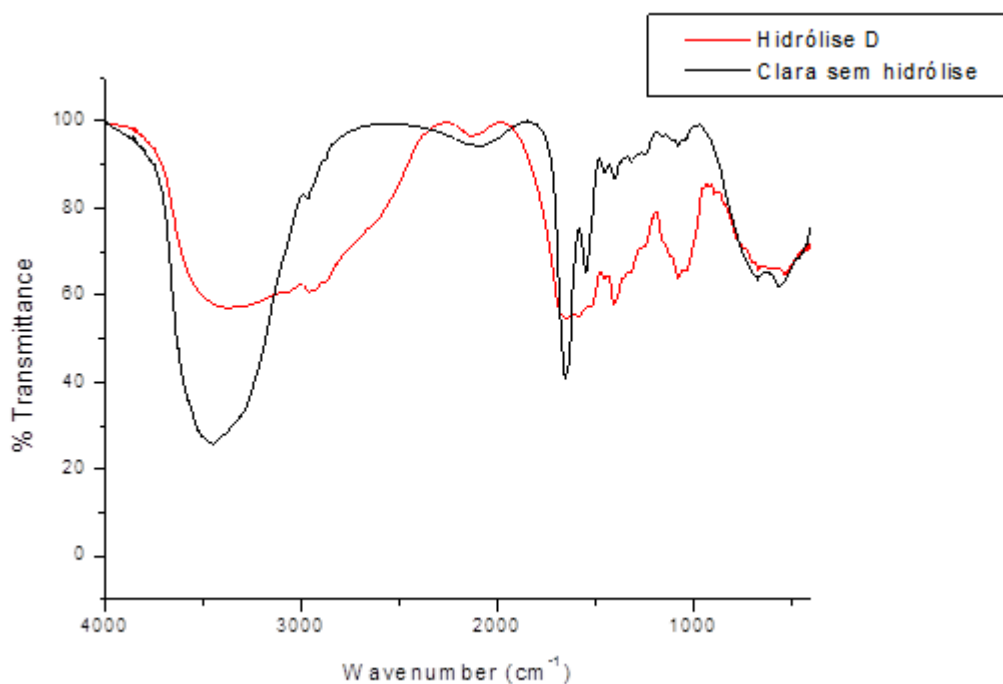


Figura 11. Espectros vibracionais da clara de ovo antes e após hidrólise D.

Tabela 7. Principais frequências vibracionais no IV do material obtido na hidrólise D da clara de ovo.

Hidrólise D	Atribuição
3367 <i>m</i>	νOH
3200 <i>m</i>	νNH
2961 <i>om</i>	νCH
1587 <i>m</i>	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1402 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1329 <i>m</i>	νCC
1112 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$

1075 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
876 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
742 <i>f</i>	νCC
697 <i>f</i>	ρCH_2
668 <i>f</i>	ρOH
572 <i>f</i>	δCOO^-
514 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$

No espectro no IV da clara de ovo sem ter sido submetida à hidrólise, observa-se a presença das duas principais bandas referentes às ligações amidas: **Amida I** (1654 cm^{-1}) e **Amida II** (1547 cm^{-1}). A presença destas bandas indica a presença das ligações peptídicas nas proteínas da clara de ovo. Por outro lado, o desaparecimento destas bandas bem como o surgimento de outras no espectro vibracional do material obtido após **D**, comprova que a hidrólise da clara foi realizada com sucesso.

A Figura 12 apresenta os espectros no IV da clara in natura e do material obtido após hidrólise **C**.

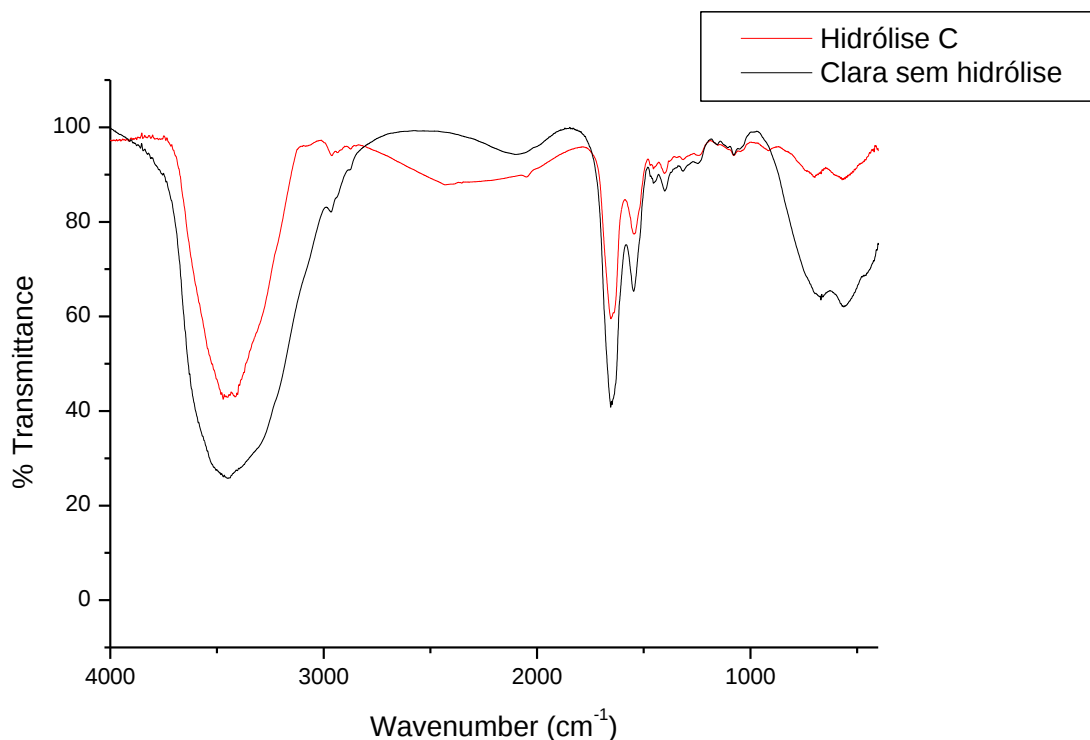


Figura 12. Espectros no IV da clara antes e após Hidrólise C.

Puderam ainda ser observadas nos espectros vibracionais no infravermelho da clara submetida à Hidrólise **C**, a presença das bandas Amida I (1653 cm^{-1}) e Amida II (1545 cm^{-1}), o que demonstra a ocorrência de uma hidrólise em menor extensão, pois tais bandas representam as ligações peptídicas das proteínas conforme já mencionado nesse relatório.

A região do espectro compreendida entre 1800 e 800 cm^{-1} é muito importante para a análise de materiais proteicos, uma vez que é neste intervalo que se observam as absorções do grupo amida (CONH)²⁷ presente nas ligações peptídicas das proteínas, Amida I e Amida II são os dois modos de vibrações mais importantes do grupo amida (Figura 13). A absorção referente ao modo vibracional amida I é observada, em geral, no intervalo de $1655\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$ que apresenta contribuição principalmente do modo de estiramento da ligação C=O , enquanto que o modo de

vibração amida II é esperado no intervalo de $1591\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$ associado aos movimentos de deformação N–H e estiramento C–N. É sabido que as frequências exatas em que estas ligações amidas absorvem dependerão da estrutura secundária das proteínas ou peptídeos²⁷.

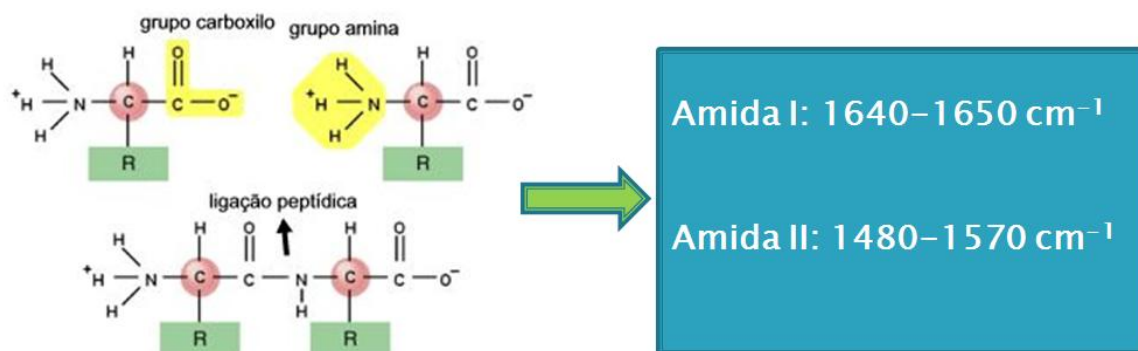


Figura 13. Representação dos grupos carboxila e amina na estrutura de um aminoácido e identificação dos modos vibracionais Amida I e Amida II no IV.

4.4.2- Compostos metálicos

A Figura 14 mostra os espectros vibracionais no IV da clara *in natura* e do composto **CO-Pt1**, e a Tabela 8 mostra as principais frequências vibracionais no IV do composto **CO-Pt1** e respectivas atribuições.

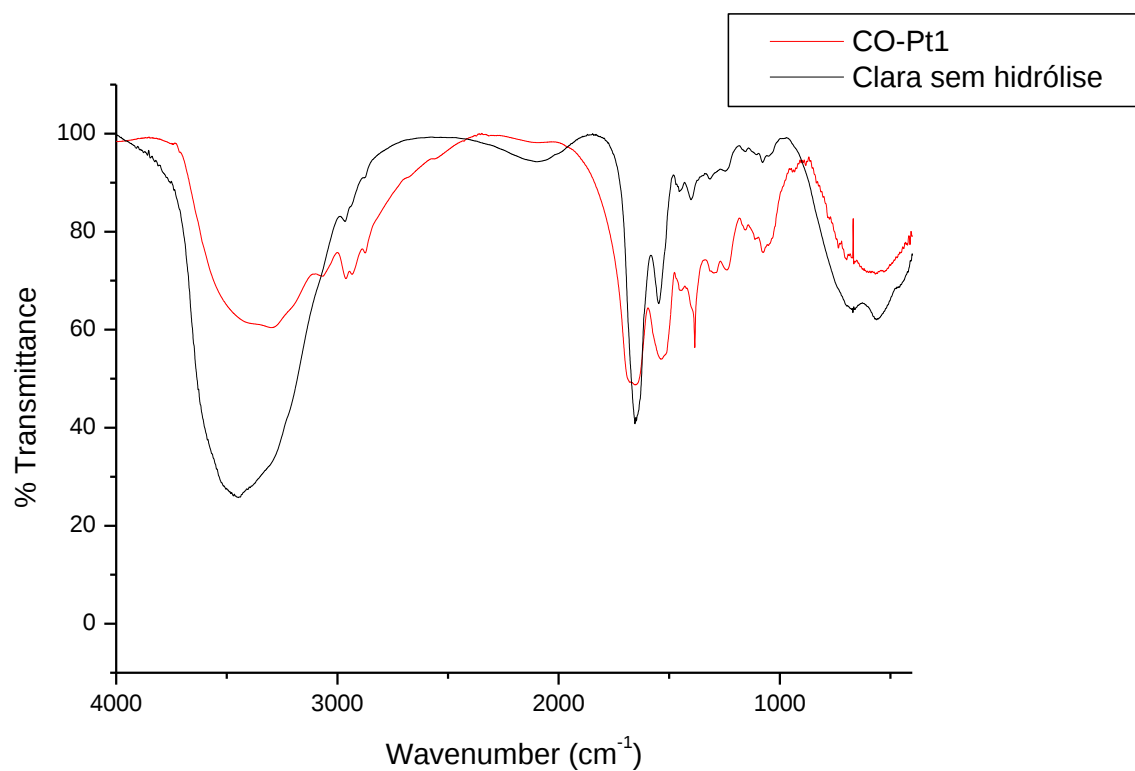


Figura 14. Espectros no IV da clara não hidrolisada e da amostra CO-Pt1.

Tabela 8. Principais frequências vibracionais no IV da amostra CO-Pt1.

CO-Pt1	Atribuição
3363 <i>m</i>	νOH
3295 <i>m</i>	νNH
2961 <i>om</i>	νCH
1654 <i>m</i>	Amida I
1537 <i>m</i>	Amida II+ $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1315 <i>m</i>	νCC

1103 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1074 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
1051 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
735 <i>f</i>	νCC
697 <i>f</i>	ρCH_2
606 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$

No espectro vibracional do **CO-Pt1**, foi possível observar pequenos deslocamentos das bandas Amida I e II (1654 e 1547 cm^{-1} , respectivamente) quando comparadas ao espectro da clara não hidrolisada, o que permite inferir que houve interação entre o íon Pt(II) e as proteínas presentes na clara do ovo.

Apesar de não ser possível prever o modo como as proteínas da clara do ovo interagem com a platina, há estudos²⁸ que mostram, por exemplo, como a ovotransferrina, uma das principais proteínas presentes na clara de ovo, interage com o ferro, como mostrado na Figura 15.

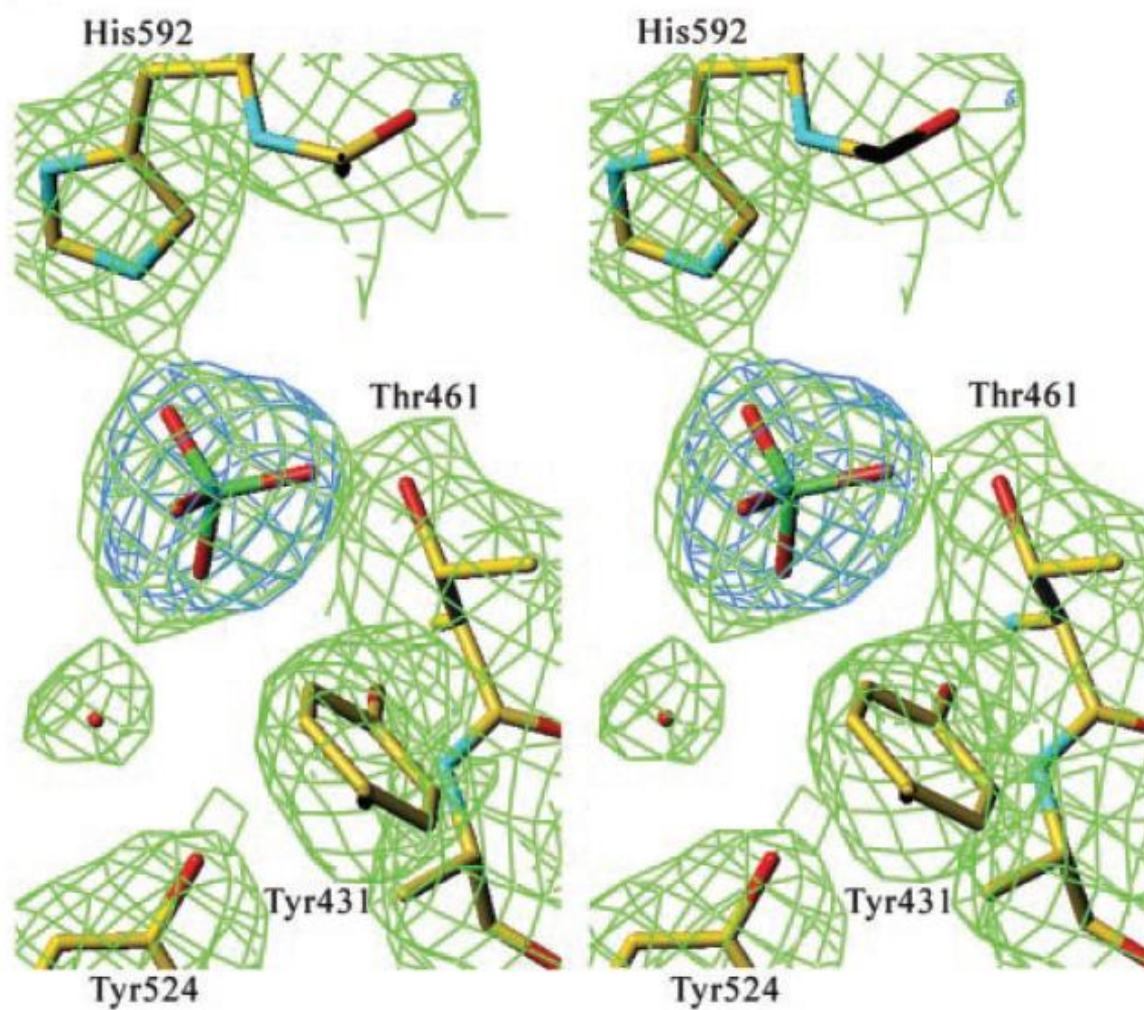


Figura 15. Mapa de densidade eletrônica mostrando os sítios de ligação entre os aminoácidos e o ferro (esferas vermelhas)²⁸.

A Figura 16 mostra os espectros vibracionais no IV da clara submetida à hidrólise **C** e do composto **CO-Pt2**, enquanto que a Tabela 9 mostra as principais frequências vibracionais no IV desse composto e atribuições das bandas observadas.

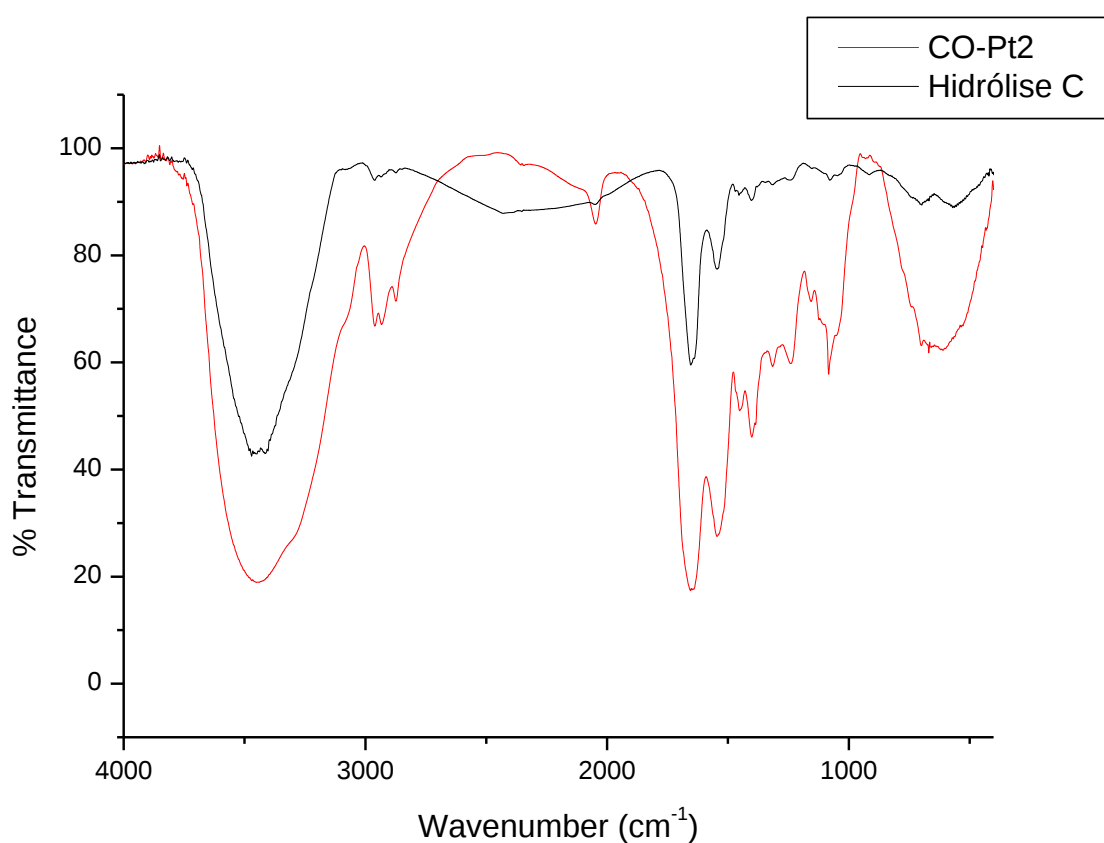


Figura 16. Espectros no IV da clara submetida à Hidrólise C e da amostra CO-Pt2.

Tabela 9. Principais frequências vibracionais no IV da amostra CO-Pt2.

CO-Pt2	Atribuição
3439 <i>F</i>	νOH
3200 <i>m</i>	νNH
2960 <i>m</i>	νCH
1655 <i>F</i>	Amida I
1544 <i>m</i>	Amida II+ $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1385 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1315 <i>m</i>	νCC
1123 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1083 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
740 <i>m</i>	νCC
699 <i>m</i>	ρCH_2
669 <i>m</i>	ρOH
609 <i>m</i>	δCOO^-
477 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$

No espectro vibracional do **CO-Pt2**, também foi possível observar pequenos deslocamentos das bandas Amida I e II (1654 e 1547 cm^{-1} , respectivamente) quando comparadas ao espectro da **Hidrólise C**, que não ocorreu de forma efetiva, permitindo inferir que houve interação entre o íon Pt(II) e as proteínas da clara de ovo

A Figura 17 mostra os espectros vibracionais no IV da clara não hidrolisada e do composto **CO-Pd8** e a Tabela 10 mostra as principais frequências vibracionais no IV do composto **CO-Pd8**.

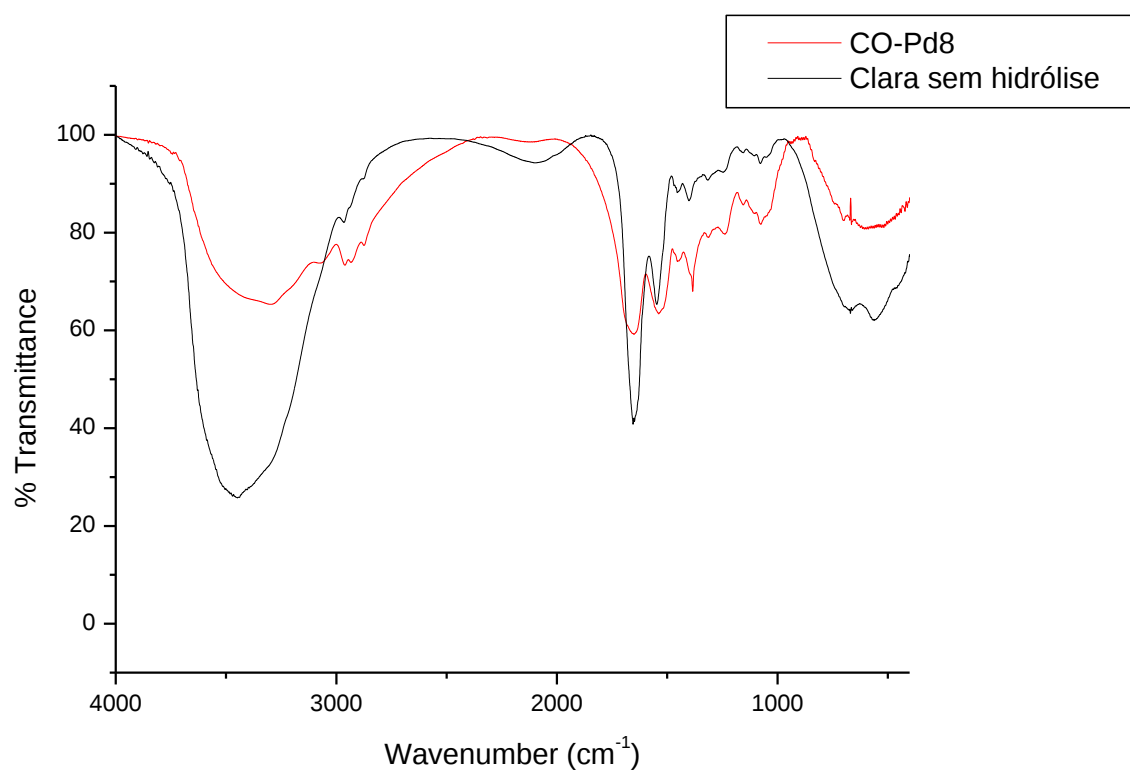


Figura 17. Espectros no IV da clara não hidrolisada e da amostra CO-Pd8.

Tabela 10. Principais frequências vibracionais no IV do composto CO-Pd8.

CO-Pd8	Atribuição
3400 <i>mf</i>	ν OH
3296 <i>mf</i>	ν NH

2961 <i>om</i>	νCH
-	$\nu\text{C=O}$
1656 <i>m</i>	Amida I
1538 <i>m</i>	Amida II+ $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
-	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1384 <i>m</i>	Amida III
1312 <i>m</i>	νCC
1102 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1075 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
1048 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
-	$\delta\text{C-H}$
-	νCC
698 <i>f</i>	ρCH_2
664 <i>f</i>	ρOH
606 <i>f</i>	δCOO^-
490 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$

Exatamente como já observada para a amostra análoga de platina, aqui também observam-se alterações de intensidade e pequenos deslocamentos entre os dois espectros, o que permite sugerir estar havendo interação entre a proteína e o centro metálico de paládio.

Além disso, foi observada também uma grande semelhança entre os espectros vibracionais deste composto **CO-Pd8** e **CO-Pd7** (ver a seguir), que corresponde ao produto da síntese com material obtido da hidrólise **C**. Como já mencionado anteriormente, não houve hidrólise efetiva naquele caso e, portanto, esses dois compostos de paládio podem-se tratar da mesma espécie.

A Figura 18 mostra os espectros vibracionais no IV do composto **CO-Pd7** e a Tabela 11 mostra as principais frequências vibracionais no IV dessa amostra de Pd(II)

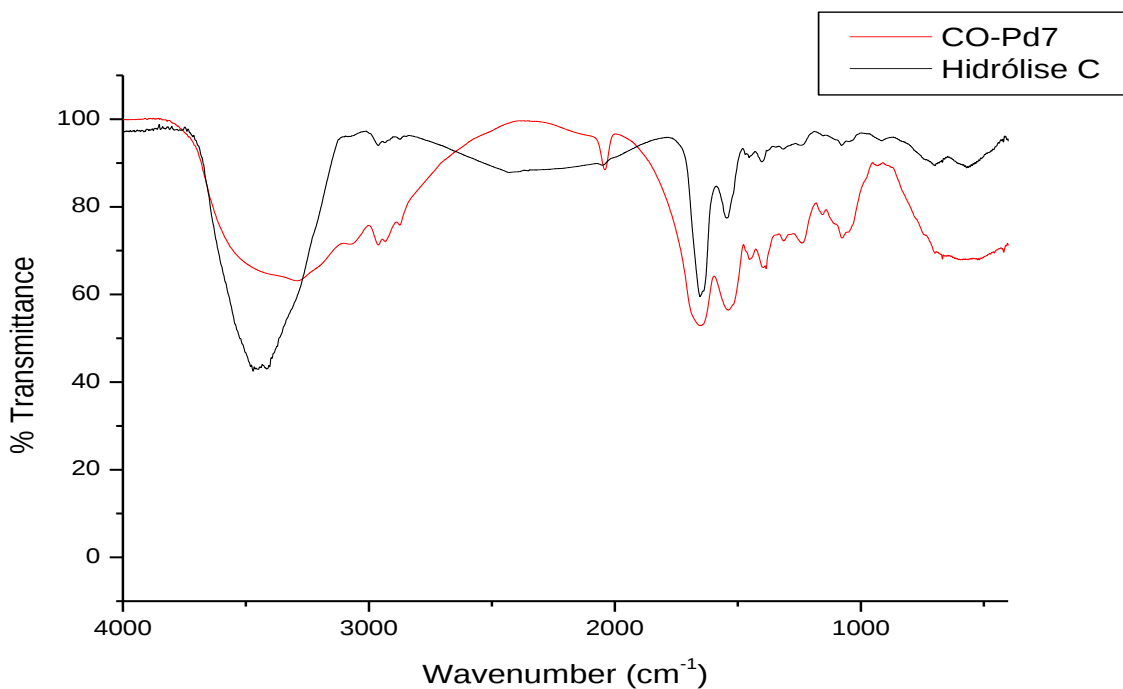


Figura 18. Espectros no IV do material obtido na Hidrólise C e da amostra CO-Pd7.

Tabela 11. Principais frequências vibracionais no IV do composto CO-Pd7.

CO-Pd 7	Atribuição
3370 <i>m</i>	νOH
3293 <i>m</i>	νNH
2961 <i>om</i>	νCH
1655 <i>m</i>	Amida I
1541 <i>m</i>	Amida II+ $\nu_{\text{as}}\text{COO}^- + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1384 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1313 <i>f</i>	νCC
1103 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
1076 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
931 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
776 <i>f</i>	νCC
701 <i>f</i>	ρCH_2
606 <i>f</i>	δCOO^-

A Figura 19 apresenta os espectros vibracionais no IV do material obtido após a hidrólise **C** e do composto **CO-Ag3** e a Tabela 12 mostra as principais frequências vibracionais no IV do composto **CO-Ag3**.

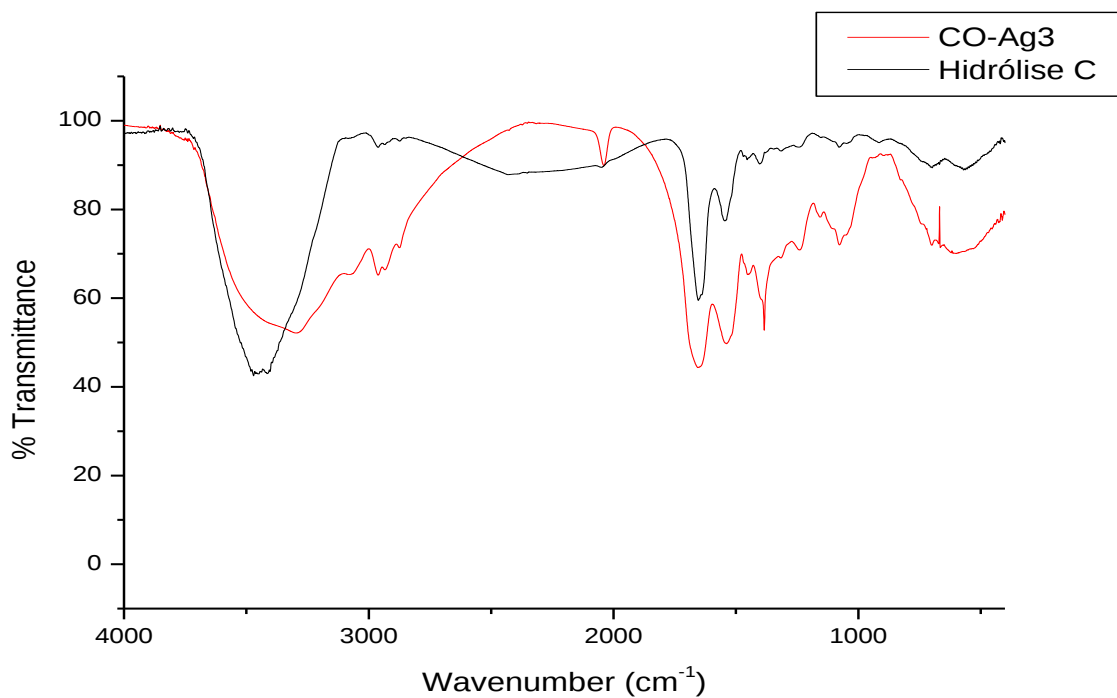


Figura 19. Espectros vibracionais no IV comparativo entre Hidrólise C e da amostra CO-Ag3.

Tabela 12. Principais frequências vibracionais no IV do composto CO-Ag3.

CO-Ag3	Atribuição
3360 <i>m</i>	ν OH
3200 <i>m</i>	ν NH
2961 <i>om</i>	ν CH
1655 <i>mF</i>	Amida I
1541 <i>m</i>	Amida II+ ν_{as} COO ⁻ + δ_{as} NH ₂

1384 <i>m</i>	$\nu_s\text{COO}^-$
1316 <i>m</i>	νCC
1077 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
942 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
699 <i>f</i>	ρCH_2
664 <i>f</i>	ρOH
604 <i>f</i>	δCOO^-

Mais uma vez pode-se inferir que houve interação entre o metal (íons prata nesse caso) e o material proteico, já que seus comportamentos no espectro IV são diferentes, alterando/ redefinindo as bandas Amida I e II.

As frequências vibracionais no IV do **CO-Ag3** se diferenciam muito das observadas na **Hidrólise C**, fato que se complementa com a diferença de cores observada entre a cor da clara e a do composto obtido, sendo a clara de ovo amarelo claro e o **CO-Ag3** que se apresentou em tons variando de vermelho a marrom. Esse composto se mostrou instável em presença de luz, devendo ficar protegido por papel laminado e/ou armazenado em local escuro.

Como dito anteriormente na introdução, a prata tem a tendência de se ligar a três aminoácidos: arginina, lisina e histidina. Apesar de não conterem enxofre em suas estruturas, e sim grupos carboxilato e amino, são capazes de interagir com a prata, fato que evidencia, mais uma vez, a interação entre este metal e os aminoácidos presentes na clara de ovo.

A Figura 20 mostra os espectros vibracionais no IV da clara submetida à hidrólise **D** e do composto **CO-Pd9**, e a Tabela 13 mostra as principais frequências vibracionais no IV do composto **CO-Pd9**.

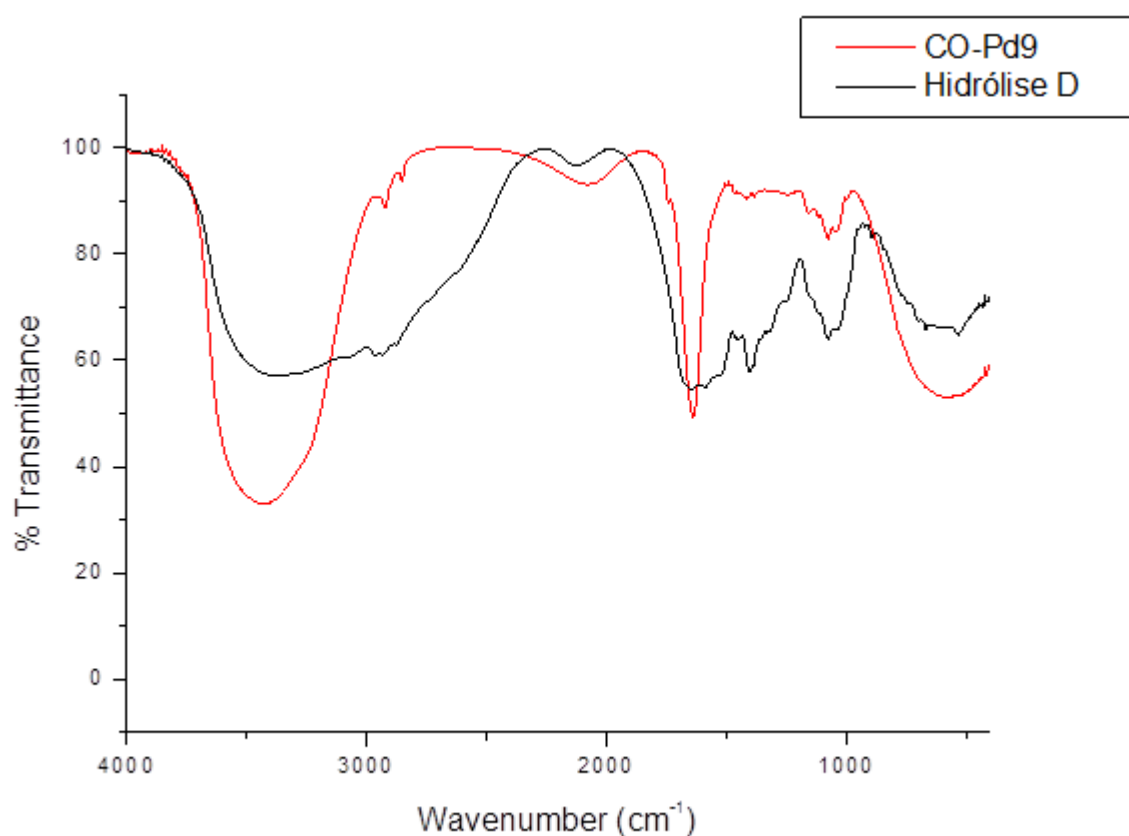


Figura 20. Espectros no IV da clara após hidrólise e da amostra CO-Pd9.

Tabela 13. Principais frequências vibracionais no IV do composto CO-Pd9.

CO-Pd9	Atribuição
3393 <i>F</i>	ν OH
3250 <i>m</i>	ν NH
2910 <i>F</i>	ν CH

-	Amida I
1637 <i>F</i>	$\nu_{as}COO^-$
1405 <i>m</i>	ν_sCOO^-
1330 <i>m</i>	ν_{CC}
1045 <i>m</i>	ν_{C-O}
1077 <i>m</i>	$\nu_{C-O} + \nu_{CN} + \delta_{C-H}$
878 <i>f</i>	δ_{C-H}

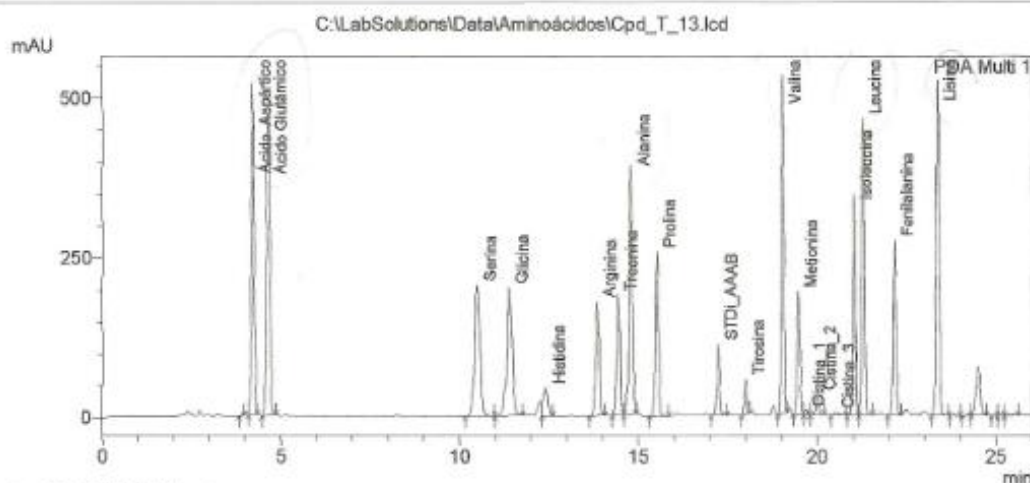
Neste caso, a sugestão desse trabalho é que houve neste caso, como desejado, a coordenação do íon Pd(II) a grupos amino e carboxilatos de resíduos de aminoácidos obtidos na hidrólise da clara de ovo. A técnica de espectroscopia vibracional permitiu diagnosticar, a partir do espectro da amostra **CO-Pd9**, duas bandas associadas aos modos vibracionais $\nu_{as}COO^-$ (1637 cm^{-1}) e ν_sCOO^- (1405 cm^{-1}), bem como uma banda ν_{C-O} , em 1045 cm^{-1} , o que revela um segundo e distinto sítio de coordenação para o íon Pd(II) nessa amostra.

4.5 - Análise de aminoácidos na amostra CO-Pd2

Esse experimento foi realizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas, e consistiu na análise de aminoácidos livres, realizado por cromatografia em coluna de fase reversa em cromatógrafo líquido de alta eficiência, com derivatização pré-coluna com fenil isotiocianato. Uma amostra foi selecionada para o ensaio, sendo esta a clara de ovo hidrolisada (**B**) complexada com Pd(II), composto **CO-Pd2**.

Os resultados da análise de aminoácidos para a amostra **CO-Pd2** estão apresentados na Figura 21 e na Tabela 14.

CROMATOGRAMA



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

RESULTADOS

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark
1	Ácido Aspártico	4.208	2492153	517918	7.47407	g/100g	
2	Ácido Glutâmico	4.642	2908707	476084	9.86548	g/100g	
3	Serina	10.486	2138304	205684	4.26436	g/100g	
4	Glicina	11.387	2117789	200832	2.53396	g/100g	
5	Histidina	12.415	399777	44322	1.48875	g/100g	
6	Arginina	13.852	1186161	179533	4.54561	g/100g	
7	Treonina	14.435	1229208	190843	3.05797	g/100g	
8	Alanina	14.777	2656680	390315	3.73121	g/100g	V
9	Prolina	15.506	1523561	256818	2.31215	g/100g	
10	STD1_AAAB	17.226	614441	112917	0.00000	g/100g	
11	Tirocina	17.991	252683	55918	0.80418	g/100g	
12	Valina	19.021	2634245	530045	4.70893	g/100g	
13	Metionina	19.467	1039181	193326	2.36680	g/100g	
14	Cistina_1	19.692	29104	6678	0.03006	g/100g	
15	Cistina_2	20.002	181728	32740	0.84125	g/100g	
16	Cistina_3	20.515	39320	4218	4.06136	g/100g	
17	Isoleucina	21.018	1825789	346467	3.93824	g/100g	
18	Leucina	21.265	2511210	465386	5.71308	g/100g	V
19	Fenilalanina	22.153	1474843	273135	4.50988	g/100g	
20	Lisina	23.354	2972236	524489	5.65289	g/100g	

Grouping Results

PDA

Group#	Group Name	Area	Height	Conc.	Units
1	Total	30227120	5007667	71.900	g/100g

Figura 21. Análise de aminoácidos da amostra de clara de ovo hidrolisada complexada com íons Pd(II), amostra CO-Pd2.

A análise do cromatograma permite verificar que as maiores expressões de aminoácidos foram para os Ácidos Aspártico e Glutâmico (ID# 1 e 2,

respectivamente), Alanina (ID# 8), Valina (ID# 12), Leucina (ID# 18) e Lisina (ID# 20), de acordo com as áreas dos picos expressos para cada um deles. As áreas dos picos da clara de ovo foram quantificadas em comparação com as de uma mistura padrão de aminoácidos e os aminoácidos identificados através dos seus tempos de retenção, conhecidos comparativamente ao padrão. Vale lembrar que o ID# 10 (STD_i_AAAB) se trata do padrão interno utilizado na análise.

A Cistina é expressa como a soma dos dois primeiros picos, apenas da Cistina 1 e Cistina 2. A Cistina 3 foi desconsiderada, já que os valores são muito elevados; por esse mesmo motivo, o valor total em gramas de proteína diminui, passando de 71,90g para 67,84g/100g de amostra, segundo a Tabela 14.

Tabela 14. Teor de aminoácidos da amostra CO-Pd2 expresso em relação à quantidade de amostra e de proteína.

AMINOÁCIDOS	CO-Pd2 (g/100g amostra)	CO-Pd2 (g/100g proteína)
Ácido Aspártico	7,47	11,02
Ácido Glutâmico	9,87	14,54
Serina	4,26	6,29
Glicina	2,53	3,74
Histidina	1,49	2,19
Arginina	4,55	6,70
Treonina	3,06	4,51
Alanina	3,73	5,50
Prolina	2,31	3,41
Tirosina	0,80	1,19
Valina	4,71	6,94
Metionina	2,37	3,49
Cistina_1	0,03	0,04
Cistina_2	0,84	1,24
Isoleucina	3,94	5,81
Leucina	5,71	8,42
Fenilalanina	4,51	6,65
Lisina	5,65	8,33
TOTAL	67,84	100,00

Na parte inferior direita da Figura 21, nota-se que a concentração de aminoácidos na amostra é de 71,90g/100g, indicando que a análise foi feita com sucesso, já que se obteve uma massa compatível para tal.

A análise deste cromatograma permite observar que há grande quantidade de aminoácidos presentes nessa amostra, o que dificulta a proposição de uma estrutura para o complexo formado entre o “ligante orgânico” (hidrolisado proteico) e o íon paládio(II).

A Figura 22 mostra os espectros vibracionais no IV do composto **CO-Pd2**, e a Tabela 15 mostra as principais frequências vibracionais na região do IV do composto **CO-Pd2**.

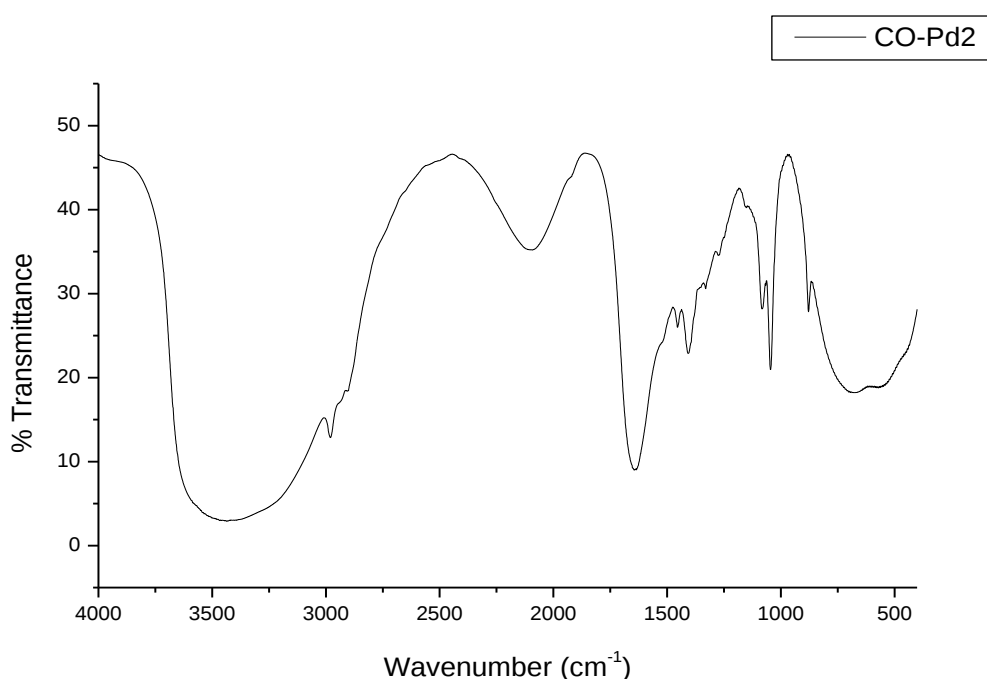


Figura 22. Espectros vibracionais na região do IV do composto CO-Pd2.

Tabela 15. Principais frequências vibracionais na região do IV do composto CO-Pd2.

CO-Pd2	Atribuição
3435 <i>F</i>	νOH
3200 <i>m</i>	νNH
2980 <i>m</i>	νCH
1645 <i>F</i>	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1407 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1330 <i>m</i>	νCC
1083 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
878 <i>m</i>	$\delta\text{C-H}$
752 <i>m</i>	νCC
667 <i>m</i>	ρOH

A presença das bandas $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ (1645 cm^{-1}), $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (1407 cm^{-1}) e $\nu\text{C-O}$ (1083 cm^{-1}), principalmente, demonstram que houve a complexação do paládio aos aminoácidos, indicando estes grupos como prováveis pontos de coordenação.

4.6- Ensaios Biológicos

4.6.1- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à *E. coli* ATCC 25922.

Para esta análise foram utilizados os compostos **CO – Ag3**, **CO – Pt2** e **CO – Pd7**. Além disso, foi utilizado como controle o material obtido na **Hidrólise C** da clara

de ovo (com o qual foram realizadas as sínteses dos compostos analisados), a clara de ovo *in natura* e os precursores metálicos utilizados nas sínteses.

O controle de esterilidade do meio de cultura e o controle de crescimento da cepa estavam adequados. O controle positivo com ampicilina para todos os testes foi igual a 12,5µg/mL, sendo que os mesmos foram realizados em duplicata.

A Figura 23 mostra os resultados do teste realizado, e é seguida pela Tabela 16 com sua respectiva interpretação.

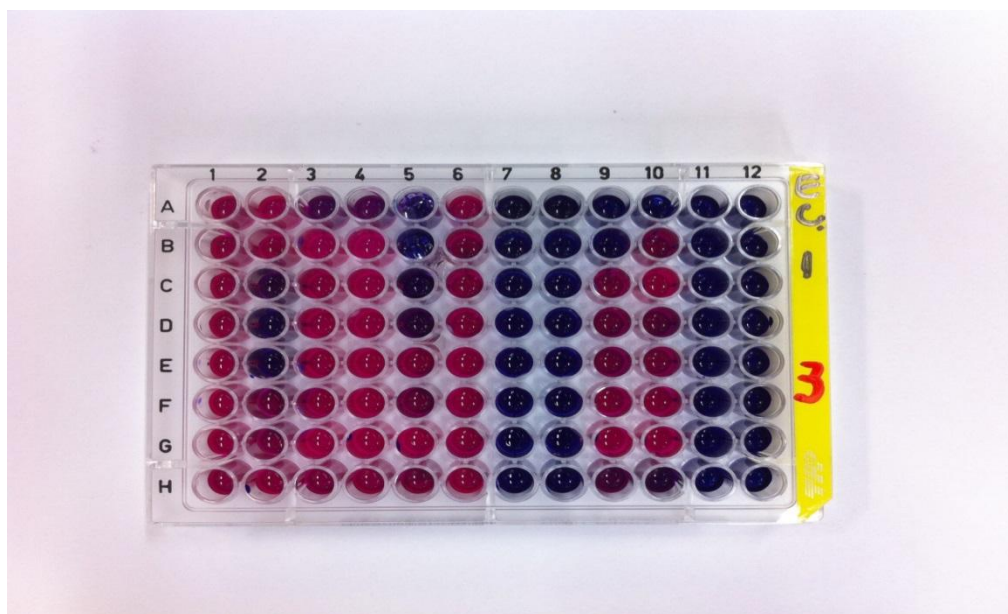


Figura 23. Resultados dos testes frente à *E. coli*. A cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa, presença de crescimento bacteriano.

Tabela 16. Resultados dos testes microbiológicos para *E. coli*.

Amostra testada	Atividade inibitória	CIM
Hidrólise C	Não	
Clara crua	Sim	
AgNO ₃	Sim	Inibição total
CO – Ag3	Sim	500µg/mL
Hexacloroplatinato	Sim	500µg/mL
CO – Pt2	Não	
Precursor Pd	-	
CO – Pd7	Não	

4.6.2- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à *S. aureus* ATCC 25923.

Para esta análise foram utilizados os compostos **CO – Ag3**, **CO – Pt2** e **CO – Pd7**, além disso, foi utilizada como controle a **Hidrólise C**, com a qual foram realizadas as sínteses dos compostos analisados, a clara de ovo in natura e os metais utilizados para as sínteses.

O controle de esterilidade do meio de cultura, e o controle de crescimento da cepa foram aprovados. O controle positivo com ampicilina para todos os testes foi 0,6µg/mL, sendo que os mesmos foram realizados em duplicata.

A Figura 24 mostra os resultados do teste realizado, e é seguida pela Tabela 17 com sua respectiva interpretação.

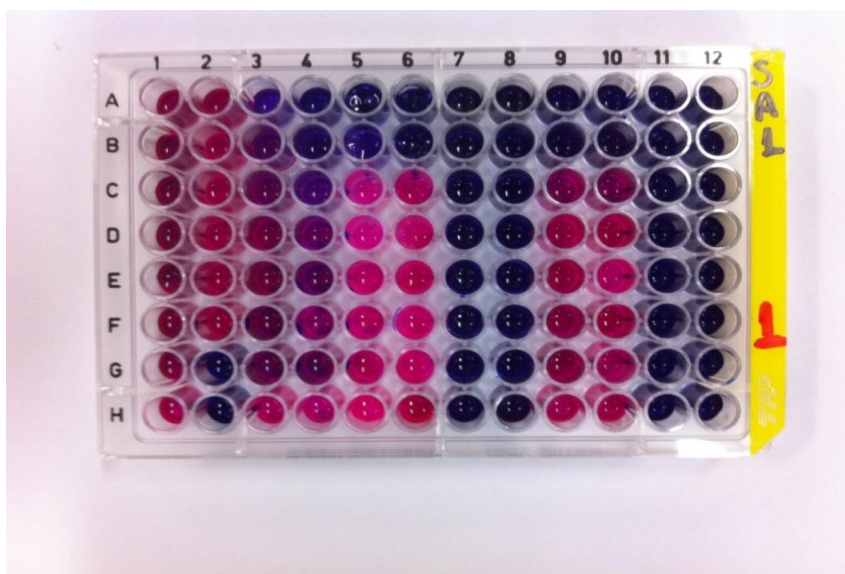


Figura 24. Resultados dos testes frente à *S. aureus*. A cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa, presença de crescimento bacteriano.

Tabela 17. Resultados dos testes microbiológicos para *S. aureus*.

Amostra testada	Atividade inibitória	CIM
Hidrólise C	Não	
Clara in natura	Sim	
AgNO ₃	Sim	Inibição total
CO – Ag3	Sim	500µg/mL
Hexacloroplatinato	Sim	500µg/mL
CO – Pt2	Não	
Precursor Pd	-	
CO – Pd7	Não	

Os resultados mostraram que o complexo formado entre a prata e o ligante orgânico demonstra inibição bacteriana, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, o que não acontece com os compostos de platina e paládio. Observa-se ainda que a clara de ovo hidrolisada também não apresenta atividade inibitória no crescimento bacteriano; uma possível causa é a provável ocorrência de hidrólise da lisozima e sua subsequente perda de função. A clara de ovo *in natura* (não hidrolisada) se mostrou capaz de inibir o crescimento desses microrganismos, por ação da lisozima, como previsto anteriormente.

5. Conclusões e Perspectivas

O trabalho desenvolvido pode ser dividido em três principais etapas. A primeira, referente à obtenção, hidrólise e análise do hidrolisado proteico obtido a partir da clara de ovo. Diversos métodos e condições experimentais foram testadas a fim de se encontrar as condições de hidrólise mais adequadas (tempo, relação enzima:substrato) para a obtenção de aminoácidos livres e/ou pequenos peptídeos.

A segunda parte, como consequência da primeira, constituiu-se da obtenção dos complexos, através de sínteses, entre o hidrolisado proteico e os metais platina, prata e paládio. Aqui também diferentes rotas sintéticas foram utilizadas. A espectroscopia vibracional no infravermelho foi utilizada nessa etapa para investigar as características estruturais (particularmente, os grupos funcionais presentes) dos compostos metálicos obtidos bem como da matéria prima utilizada (clara de ovo).

Após inúmeras tentativas de síntese, três amostras promissoras, do ponto de vista da Química de Coordenação, foram obtidas, a saber, **CO-Pd₂**, **CO-Pd₉** e **CO-**

Ag3. O fato de não ter sido obtido nenhum produto com o íon Pt(II) deve estar associado à natureza *soft* desse metal e, portanto, outras fontes proteicas serão testadas, como a semente de linhaça, que é rica em aminoácidos sulfurados (bases *softs*).

Ensaio biológico preliminar, que consistiu na terceira e última parte deste trabalho, lançou mão da utilização desses compostos na caracterização de sua capacidade inibitória de crescimento de bactérias (*S. aureus* e *E. coli*), através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Como continuidade do trabalho estão previstos a complementação do processo de caracterização dos compostos metálicos obtidos (usando espectrometria de massas, dicroísmo circular, etc.), a realização de sínteses envolvendo o hidrolisado **D** (clara de ovo) e os metais platina e prata, a extração da ovoalbumina da clara do ovo e estudo da interação com esses mesmos íons metálicos (nas formas íntegra e hidrolisada da proteína).

Há ainda perspectivas de testes utilizando esses complexos na inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (a ser realizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Unesp sob a supervisão da Profa. Dra. Clarice Queico Leite) e de atividade contra determinadas linhagens de células tumorais (em parceria com o Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto dessa Instituição).

6. Referências Bibliográficas

- [1] STEVENS, L. Egg white proteins. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 100B, n. 1, p. 1-9. 1991.

- [2] MINE, Y., MA, F., LAURIAU, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural Food and Chem**, v. 52, p.1088. 2004.

- [3] ECKHARDT, S., BRUNETTO, P.S., GANGNON, J., PRIEBE, M., GIESE, B., FROMM, K.M. Fromm, Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine, **Chemical Reviews**, 113, 7, 4708, 2013.

- [4] **CHEN, C.; CHI. Y. J.; ZHAO, M. Y.; LV, L.** Purification and identification of antioxidant peptides from **egg white protein** hydrolysate. *Amino Acids*. V.43(1), pp. 457-66. 2012.

- [5] GRASZKIEWICZL, A.; ZELAZKOL, M.; TRZISKAL, T.; POLANOWSKI, A. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. **Polish journal of food and nutrition sciences**.Vol. 57, No. 4(A), pp. 195-199. 2007.

- [6] STABILE, M. N. O; BARUFFALDI, R. Grau de hidrólise e solubilidade de hidrolisados proteicos de clara de ovo. **Sistema eletrônico de revistas UFPR**. V.6, n. 2, 1988.

- [7] LIN, S., GUO, Y., Q., YIN, Y. and LIU, J. Preparation of antioxidant peptide from egg white protein and improvement of its activities assisted by high-intensity pulsed electric field. **J. Sci. Food Agric.**, 92: 1554–1561. doi: 10.1002/jsfa.4742. 2012
- [8] SHRIVER, D.F., ATKINS, P.W. Inorganic chemistry. **Oxford: Oxford University Press**, 763 p., 1999.
- [9] NELSON, D.L.; COX, M.M.. Lehninger princípios de bioquímica. São Paulo, 3. ed. p.89-91, 2002.
- [10] BIOQUIMICA'S HOME PAGE, 2013
<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/aminoacidos.html>. Acesso em: 09/09/2013.
- [11] STANILA, A.; MARCU A.; RUSU, D. ; RUSU, M. ; DAVID, L. Spectroscopic studies of some copper (II) complexes with amino acids. **J. Mol. Struct.**, v. 834–836, p.364–368, 2007.
- [12] LACTEA BRASIL, 2013 <http://www.lacteabrasil.org.br>. Acesso em: 09/09/2013.
- [13] FILHO, M.A. A nata do soro - proteína retirada de subproduto do leite reforça defesa do organismo. **Jornal Unicamp**. Campinas, p. 2, 2002.
- [14] KOSIKOWSKI, F. U. Whey utilization and whey products. **J. Dairy Sci.**, v. 62, n.7, p.1149-1160, 1979.

[15] MARQUES, D. P.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J. ; GIORDANO, R. C.; GIORDANO R. L. C. ; MONTI, R. Separação das proteínas do soro do leite por Deae Trisacryl. **Alim. Nutr.** v. 16, n. 1, p. 17-20, 2005.

[16] ECKHARDT, S., P. S. BRUNETTO, et al. Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. **Chem Rev**, 2013.

[17] DE ALMEIDA, E. T., et al . Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio(II) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, 2005.

[18] GUERRA, WENDELL, et al . Síntese e caracterização de novos complexos de platina (II) com ligantes derivados do furano e nitrofurano. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, 2005.

[19] MEMARPOOR-YAZDI, M., ASOODE, A.; CHAMANI, A. A. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of functional foods**. p: 278-286, 2012.

[20] REHAGRO, 2013. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/>
Acesso em: 10 de setembro de 2013.

[21] SILVA, F. A.; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M.; Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, v. 69, n.4, p.1025-1030, 2006.

[22] BIASUTTI, E. A. R., et al. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 44, n. 1, 2008.

[23] CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

[24] HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

[25] PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

[26] O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

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

[28] MIZUTANI, K.; MURALJDHARA, B.K.; YAMASHITA, H.; TABATA, S.; MIKAMI, B.; HIROSE, M. Anion-mediated Fe³⁺ release mechanism in ovotransferrin C-lobe: a structurally identified SO₄(²⁻) binding site and its implications for the kinetic pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38 p. 35940–35946, 2001.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Data da correção do relatório: 10/01/2014



Assinatura

Aluna: Ana Paula Carrillo Trindade de Ávila

Data da ciência das correções: 10/01/2014

Assinatura