

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**Síntese, caracterização e avaliação biológica de quelatos metálicos
contendo ligantes de origem natural**

ALINE RENATA PAVAN

ARARAQUARA – SP

2015

ALINE RENATA PAVAN

**Síntese, caracterização e avaliação biológica de quelatos metálicos
contendo ligantes de origem natural**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Co-orientadora: Dra. Patrícia Bento da Silva

ARARAQUARA – SP

2015

Dedico à minha família, e amigos
que me apoiaram para chegar aqui e,
em especial, à minha co-orientadora, Paty.

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento, sem dúvidas, vai para meus pais (Nelson e Nadir). Eles, mais do que ninguém, acreditaram no meu potencial e me deram suporte e incentivo para chegar longe. Pai e mãe, obrigada por toda segurança que vocês me deram durante esses 7 anos longe de casa; obrigada por sempre acreditarem em mim, e verem uma pessoa que às vezes nem eu via; obrigada pelo suporte, obrigada pela amizade, obrigada por existirem.

Meus irmãos, Paulo e Fernando, crescemos juntos, mas só conheci a pessoa maravilhosa que vocês são quando saí de casa. Paulo, você esteve por perto sempre que precisei, e em momentos que não imaginei que estaria. Você me defendeu como ninguém nunca o fez, e não sabe o quanto agradeço por isso, e o quanto te amei mais a partir daquele momento. Fer, você foi o irmão, apoio e maior exemplo que poderia ter fora de casa. Encontrei em você a pessoa que me fez enxergar muitas coisas de modo diferente, acreditar em meu potencial, e me mostrou que posso chegar onde quiser. Agradeço tudo o que você fez por mim, e nunca tenha dúvida que eu faria qualquer coisa por você.

Monica e Miriane, minhas “cu”nhadas. Assim como meus irmãos, estiveram do meu lado sempre, direta ou indiretamente. Encontrei em vocês pessoas maravilhosas, batalhadoras e, sem dúvida, muito sinceras. Através de vocês ganhei sobrinhos/afilhados pelos quais eu daria minha vida.

Gabriel e Valentina, não tenho palavras para explicar o quanto amo vocês. Ser tia, com certeza, é a melhor função que pode existir. E ser tia de vocês é melhor ainda. Ga, continue sempre sendo essa pessoa encantadora, e extremamente inteligente. Tenho certeza que você ainda vai me orgulhar muito. Valentina, você ainda é pequena, mas já demonstra o quão forte vai ser. Te ver sorrindo é uma das coisas que mais me deixa feliz. Saibam que não importa onde eu esteja, muito mais do que tia/madrinha, sou a pessoa que vocês podem contar pro que precisarem.

Paty (Patrícia Bento), sem você este trabalho não existiria. Você foi a pessoa que fez com que eu me apaixonasse pela química, pela pesquisa. Nunca vou me esquecer do meu primeiro dia no laboratório, onde você fez uma reação com cobre que mudava de cor, apenas para me impressionar. Ali começaria uma amizade que

quero levar para a vida toda. Mesmo sem me conhecer direito você me ajudou, e muito. Sua presença no laboratório fez toda diferença enquanto estivemos lá. É uma honra enorme ter você como co-orientadora, e a você dedico este TCC.

Às melhores amigas que poderia ter na faculdade (Fernanda, Jéssica, Thais e Camila). As diferenças existentes entre nós se desfaziam quando estávamos juntas, e isso sempre foi motivo para que eu soubesse que tinha as pessoas certas ao meu lado. Vocês sempre me respeitaram, e a sinceridade (às vezes exagerada rs) entre nós sempre esteve em primeiro lugar. Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelas festas e correrias dos trabalhos, sem vocês a faculdade teria sido totalmente sem graça.

Agradeço à Maria e Esther pela amizade repentina no último ano de faculdade. Vocês se tornaram pessoas tão importantes, e que amo tanto, que fica impossível agradecer-las e elogiá-las em apenas um parágrafo. Apenas posso dizer que se cada um tem o que merece, eu devo ser uma pessoa ótima por ter vocês comigo.

Agradeço aos colaboradores que auxiliaram muito neste projeto: Prof. Dr. Rubens Monti e Dra. Juliana Cristina Bassan, obrigada pela ajuda e paciência sempre, sem o auxílio de vocês este trabalho não existiria. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, obrigada pelo auxílio nas análises realizadas no ITAL, e por todo o suporte na realização do projeto. Maria Elisa Caetano Silva, obrigada por toda ajuda, e disposição em ajudar na realização do projeto, fiquei muito feliz por ter tido a oportunidade de conhecê-la.

Agradeço também à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Regina, por toda a paciência em todo o tempo de estágio, e por ser essa pessoa sempre alegre e sincera. Esse projeto começou com uma ideia sua e, apesar de todos os tropeços e dificuldades na realização do mesmo, não desistiu, muito pelo contrário, demonstrou que quando se acredita em algo é necessário paciência e perseverança.

RESUMO

O trabalho que será aqui apresentado teve como finalidade reunir os resultados obtidos dentro do *Laboratório de Organometálicos II* em relação aos estudos realizados acerca da interação de íons metálicos com ligantes orgânicos naturais. Os dados apresentados foram obtidos pela autora deste trabalho, e também pelos professores Francisco Otávio Cintra Ferrarini, José Roberto Stefanelli Junior e pela aluna de Iniciação Científica Angélica Romão Carvalho. Hidrolisado proteico de soro de leite bovino e torta de linhaça foram os materiais obtidos, após uma série de operações que envolveram filtração com caulim, diálise, hidrólise enzimática, liofilização, etc., após as quais foram utilizados neste trabalho como ligantes de origem natural. Os metais de transição cobre, ferro, cobalto, zinco, paládio, platina e prata foram utilizados nas reações de complexação com os hidrolisados para obtenção de complexos metálicos, através do uso de diferentes rotas sintéticas (convencional, micro-ondas, hidrotérmica, difusão) e parâmetros experimentais (pH, solvente, natureza do precursor, etc.). A escolha dos íons metálicos baseou-se no interesse em preparar compostos que apresentassem ao mesmo tempo alta biodisponibilidade, baixa citotoxicidade e diversas aplicações biológicas. O uso do cobalto deveu-se à reconhecida propriedade que os micro-organismos do sistema digestório dos ruminantes apresenta de sintetizar a vitamina B12 e, portanto, os compostos desse metal podem ser usados em rações visando um melhor desenvolvimento do animal. O ferro, conhecidamente, é um importante metal para os seres humanos, estando presente na hemoglobina, sendo assim, também consiste em uma substância nutracêutica de relevado interesse. À propósito, cabe salientar que os compostos de ferro (III) obtidos nesse trabalho serão objeto de avaliação do uso como suplemento alimentar, em colaboração com o Departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Por sua vez, os íons cobre e zinco são constituintes importantes na composição de fertilizantes, paládio e platina podem se constituir em agentes potencialmente antitumorais, e os compostos de Cu (II) deste trabalho estão sendo investigados como inibidores do crescimento da bactéria *Xanthomonas citri*, causadora do cancro cítrico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido.	14
Figura 2. Estrutura da vitamina B12.	17
Figura 3. Compostos antitumorais contendo metais de transição distintos da Pt(II).	23
Figura 4. Estrutura proposta para o complexo $[Ag(C_{11}H_{11}N_2O_2)]$	24
Figura 5. 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.	30
Figura 6. Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.	47
Figura 7. Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.	49
Figura 8. 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.	51
Figura 9. Aminograma obtido do soro hidrolisado A.	53
Figura 10. Aminograma padrão.	54
Figura 11. Espectros vibracionais no IV do soro do leite antes (Proteína) e depois da hidrólise (Hidrolisado A).	55
Figura 12. Espectros vibracionais no IV do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise B.	58
Figura 13. Espectros vibracionais no IV dos compostos HACuI e Hidrólise A (em pastilhas de KBr).	60
Figura 14. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm ⁻¹) referentes aos compostos HACuI e Hidrólise A e suas respectivas atribuições.	62
Figura 15. Espectros vibracionais no IV dos compostos HACuIII e Hidrólise A.	64
Figura 16. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e do composto HACuIV	66
Figura 17. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e dos compostos HACuV e HACuVI	68
Figura 18. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto HBCuI	70
Figura 19. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise C, e dos compostos HCCuI , HCCuII , HCCuIII e HCCuIV	71
Figura 20. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HAFel , HAFell e HAFelll	73
Figura 21. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B, e dos compostos HBFel , HBFell e HBFelll	75

Figura 22. Espectros vibracionais na região do infravermelho do Hidrolisado A e do composto HACol .	76
Figura 23. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto HAColl .	78
Figura 24. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto HAColll .	80
Figura 25. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto HAZnl .	83
Figura 26. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto HAZnll .	85
Figura 27. Espectros vibracionais na região do infravermelho do composto HAZnlill da hidrólise A.	87
Figura 28. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto HBAgl .	89
Figura 29. Imagens MEV de HACull com ampliação de 5.000 vezes (a); 10.000 vezes (b).	91
Figura 30. Imagens MEV de HACulll com ampliação de 2.000 vezes (a); 5.000 vezes (b).	92
Figura 31. Crescimento celular para linhagens de Xcc, indicada na figura, em meio Nutriente tamponado, sem cobre e com CuSO ₄ .5H ₂ O nas concentrações de 62,5; 125,0; 187,5 e 250,0 µg·mL ⁻¹ .	95
Figura 32. Crescimento celular para a linhagem FB04 de Xcc, em meio Nutriente Agar tamponado, sem cobre e com os compostos HACulll, HACull e HACul nas concentrações 410, 2820 e 906 µg·mL ⁻¹ .	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das principais proteínas no soro do leite bovino, concentrações em g·L ⁻¹ e percentagens médias.	15
Tabela 2. Dados do leite e de sua produção por novilhas primíparas que receberam suplementos contendo metais inorgânicos (IOMs) ou “aminoácidos quelatos” (AACS) em um período de ordenha de até 305 dias.	19
Tabela 3. Composição elementar média de um adulto de 70kg de peso.	20
Tabela 4. Quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.	48
Tabela 5. Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.	49
Tabela 6. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho do soro antes da hidrólise (Proteína) e depois da hidrólise (Hidrolisado A), e suas respectivas atribuições.	55
Tabela 7. Principais frequências vibracionais no IV do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise B. ...	58
Tabela 8. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm ⁻¹) referentes aos compostos HACuI e Hidrólise A e suas respectivas atribuições ^{43, 44}	60
Tabela 9. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm ⁻¹) referentes aos compostos HACuII e Hidrólise A e suas respectivas atribuições ^{43, 44}	62
Tabela 10. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm ⁻¹) referentes aos compostos HACuIII e Hidrólise A e suas respectivas atribuições ^{43, 44}	64
Tabela 11. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e do composto HACuIV.	66
Tabela 12. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HACuV e HACuVI.	68
Tabela 13. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto HBCuI.	70
Tabela 14. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise , e dos compostos HCCuI, HCCuII, HCCuIII E HCCuIV.	72
Tabela 15. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HAFel, HAFelII e HAFelIII.	73
Tabela 16. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B, e dos compostos HBFel, HBFelII e HBFelIII.	75
Tabela 17. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente ao hidrolisado A e o composto HACol e suas respectivas atribuições.	77
Tabela 18. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente à hidrólise A e ao composto HAColl e suas respectivas atribuições.	79
Tabela 19. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente a hidrólise A, ao composto HAColl e suas respectivas atribuições.	81
Tabela 20. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente à hidrólise A e ao composto HAZnI, e suas respectivas atribuições.	83

Tabela 21. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente a hidrólise A e ao composto HAZnII, e suas respectivas atribuições.	85
Tabela 22. Frequências vibracionais na região do infravermelho referentes a hidrólise A e ao composto HAZnIII, e suas respectivas atribuições.	87
Tabela 23. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho do composto HBAgl.	90
Tabela 24. Cores, dados analíticos e intervalos de decomposição das amostras sintetizadas.	93
Tabela 25. Resultados do teor de cobre nas amostras HACuV, HACuVI, HACuIV, HCCuI, HCCuII, HCCuIII, HCCuIV.....	93
Tabela 26. Resultados do teor de ferro nas amostras HAFel, HAFelI, HAFelII, HBFel, HBFelI e HBFelII	94

Sumário

I. INTRODUÇÃO	14
I.1 - Ligantes de origem natural:	14
I.1.1 – Proteínas.....	14
I.1.2 – Hidrolisado proteico do soro de leite	15
I.1.3 – Hidrolisado proteico de semente de linhaça	16
I.2 – Importância biológica dos metais de transição	17
I.2.1 - Cobalto	17
I.2.2 – Zinco ^{16,13,17,18}	18
I.2.3 - Cobre	20
I.2.4 - Ferro	21
I.2.5 – Paládio e Platina	22
I.2.6 – Prata	23
II – MATERIAIS E MÉTODOS	25
II.1 - Hidrólise Leite A - Hidrólise das proteínas do soro de leite (FCFAR).....	25
II.1.1 - Dosagem de proteína ^{32,33} , lactos ³⁴ e gordura ³⁵	27
II.1.2 - Eletroforese (SDS-PAGE) para separação de proteínas ³⁶	29
II.2 - Hidrólise Leite B - Hidrólise das proteínas do soro do leite (Unicamp)	30
II.3 - Hidrólise C – Torta de semente de linhaça ³⁷	31
II.4 – Sínteses	32
II.4.1 – Cobre	32
II.4.2 - Ferro	36
II.4.3 – Cobalto.....	37
II.4.4 – Zinco	39
II.4.5 – Paládio	40
II.4.6 - Platina	42

II.4.7 - Prata	42
II.5 - Aminograma	43
II.6 - Análise de teor de metal	43
II.7 - Análise de proteínas e teor de aminoácidos	44
II.7.1 - Determinação de Proteínas	44
II.8 – Ensaio de resistência a complexos de cobre	45
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
III.1 - Hidrólise A	47
III.1.1 - Dosagem de açúcar redutor no soro do leite hidrolisado via processo enzimático	47
III.1.2 - Dosagem de proteína ³³	49
III.1.3 - Eletroforese do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato ³¹	50
III.1.4 - Aminograma do hidrolisado A	52
III.1.5 - Infravermelho das proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise e do hidrolisado A	54
III.2 - Hidrólise B	57
III.2.1 - Análise de proteínas	59
III.3 – Sínteses	59
III.3.1 – Cobre	59
III.3.2 – Ferro	73
III.3.3 - Cobalto	76
III.3.4 - Zinco	82
III.3.5 – Paládio e Platina	89
III.3.6 – Prata	89
III.4 - Complexometria com EDTA	90

III.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura	91
III.6 - Complexometria com EDTA, Análise Elementar e Intervalo de Decomposição.....	92
III.7 - Determinação analítica do teor de cobre e ferro	93
III.8 - ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	94
III.8.1 - Testes biológicos preliminares: Avaliação de resistência a cobre em Xcc (Xanthomonas citri subsp. citri)	94
IV. CONCLUSÃO	97
V. CONTEXTUALIZAÇÃO	98
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

I. INTRODUÇÃO

I.1 - Ligantes de origem natural:

I.1.1 – Proteínas

Proteínas são polímeros formados pelas ligações entre aminoácidos, denominadas ligações peptídicas. É possível realizar a hidrólise de tais polímeros, obtendo-se assim seus aminoácidos constituintes¹.

Os vinte aminoácidos existentes diferenciam-se devido a suas cadeias laterais, as quais variam em tamanho, estrutura e carga elétrica, propriedades estas que podem influenciar na solubilidade em água, por exemplo. Assim como mostra a Figura 1, todos os aminoácidos possuem como estrutura básica um grupo carboxila, um grupo amina e um radical ligados ao mesmo átomo de carbono.

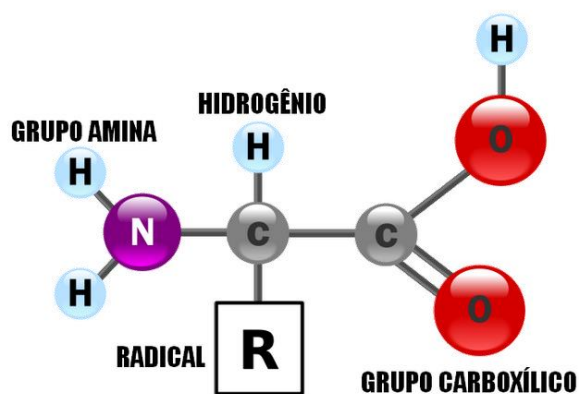


Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido.

1.1.2 – Hidrolisado proteico do soro de leite

As proteínas do soro de leite bovino estão entre as mais equilibradas fontes de aminoácidos da dieta humana. Além disso, já foram descritas muitas atividades biológicas essenciais benéficas para o ser humano.

Muitas das propriedades presentes nessas proteínas manifestam-se após a proteólise, que pode ocorrer durante o processo de digestão ou durante o processamento enzimático e/ou fermentativo².

O soro do leite é composto basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2% de lactose, 0,8 a 1,0% proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais. É um subproduto de relevante importância na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional³.

Dentre a porcentagem de proteínas, há uma mistura de beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP), com suas devidas concentrações mostradas na Tabela 1, proposta por Sgarbieri e Haraguchi^{4,5}.

Tabela 1. Distribuição das principais proteínas no soro do leite bovino, concentrações em g·L⁻¹ e percentagens médias.

Proteínas do soro	g·L⁻¹	Percentagens médias
β -lactoglobulina	3,2	45 - 57
α -lactoalbumina	1,2	15 - 25
Albumina sérica bovina	0,4	10
Imunoglobulinas	0,7	-
Lactoferrina	0,1	-
Lisozima	Desprezível	-

Já do ponto de vista aminoacídico, as proteínas de soro contêm quase todos os aminoácidos essenciais acima das recomendações da FAO/WHO⁶.

Apesar de estudos demonstrarem que o tratamento enzimático do soro do leite melhora as propriedades físicas, químicas, funcionais, organolépticas e até nutricionais das proteínas presentes no mesmo, aproximadamente 50% da produção mundial desse soro é descartada no meio ambiente sem qualquer tratamento⁷, acarretando em danos ambientais.

Como dito anteriormente, procedimentos de hidrólise permitem a obtenção dos aminoácidos constituintes destas proteínas, o que as classifica como precursores para ligantes em compostos de coordenação, sendo assim, encontra-se um destino para o soro, evitando os danos acarretados por ele ao ser descartado.

I.1.3 – Hidrolisado protéico da linhaça

O linho (*Linum usitatissimum* L.) figura entre as mais antigas culturas agrícolas cultivadas pelo homem para a obtenção de sementes para a alimentação, e fibras para confecção de tecidos⁸.

Atualmente as sementes do linho são utilizadas pela indústria na produção de tintas, plásticos, produtos cosméticos, aditivos para alimentos, entre outros⁹, além de serem consumidas como alimento.

A linhaça é constituída majoritariamente por óleo (que corresponde de 40-45% do total de seus componentes), fibras (20-25%) e proteínas (20-25%). Seu conteúdo protéico é de alta qualidade, composto em sua maioria por globulina (58-66%) e albumina (20-42%), e sua composição de aminoácidos é muita próxima à da soja, contendo grandes quantidades de ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina¹⁰. Na

matéria seca desengordurada as proteínas representam de 35-45% do total de componentes⁹.

Nos últimos anos a linhaça adquiriu um papel importante no mercado de alimentos funcionais devido a sua riqueza de componentes biologicamente ativos, como ácidos graxos poli-insaturados protetores do sistema cardiovascular e lignanas com ação antioxidante e antitumoral⁹. Pesquisas mostram também atividade antifúngica das proteínas contra *Alternaria solani*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*⁹. Tais propriedades tornam interessante a complexação com metais para possível utilização como antifúngico agrícola.

1.2 – Importância biológica dos metais de transição

1.2.1 - Cobalto

O cobalto é um importante constituinte do solo fértil, além de fazer parte de algumas enzimas e do centro ativo da molécula da Vitamina B12 (4%), ilustrada na Figura 2¹¹, vitamina esta que se apresenta estocada no fígado^{12,13}.

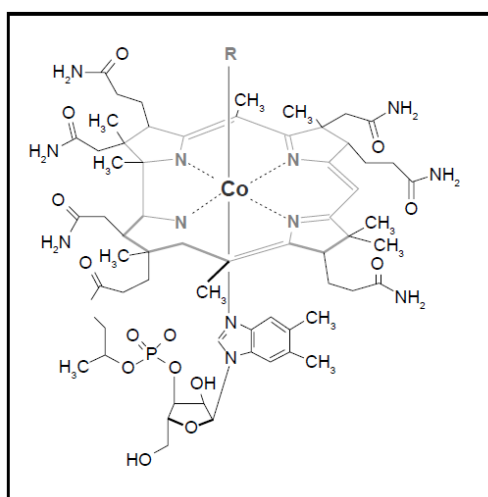


Figura 2. Estrutura da vitamina B12.

Os ruminantes herbívoros, ou seja, se alimentam, predominantemente, de vegetais. No aparelho digestório desses animais coexistem bactérias e protozoários que processam a digestão química da celulose, o que confere maior aproveitamento energético aos ruminantes.

Nos ruminantes, a exigência de cobalto é maior, pois os microrganismos em seu rúmen sintetizam a vitamina B12 (cianocobalamina)^{1,14}, o que os torna mais dependentes desse metal, em comparação aos não-ruminantes¹⁵.

Ruminantes deficientes de vitamina B12 perdem apetite e peso e acabam ficando com os músculos fracos¹⁴. Portanto, a suplementação desse metal é essencial.

A vitamina B12 presente em alimentos de origem animal é uma molécula orgânica hidrossolúvel muito complexa, necessária no funcionamento de inúmeros sistemas enzimáticos^{1,14}. Sua deficiência causa problemas na produção de eritrócitos, podendo causar também uma série de lesões no sistema nervoso central humano¹.

Indivíduos que optam por uma dieta com baixo teor de proteínas apresentam deficiências de vitamina B12, o que leva a transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares. Muitas vezes a deficiência pode permanecer assintomática por longos períodos, desencadeando uma deficiência crônica que, se mantida, pode levar a manifestações neurológicas irreversíveis¹.

1.2.2 – Zinco^{16,13,17,18}

O zinco se destaca frente aos outros metais pelas tantas funções nos organismos vivos. Além disso, o número de enzimas conhecidas que o contém como centro ativo já ultrapassa 1000².

Esse metal está presente na enzima anidrase carbônica, sendo importante nas atividades do sistema imunológico, prevenção de formação de radicais livres, crescimento estrutural, desenvolvimento sexual e cognitivo e síntese de DNA.

A deficiência de zinco atrasa o crescimento e a maturação sexual nos homens. Também diminui o apetite e paladar, funções cognitivas, acrodermatite enteropática e causa deficiências no sistema imune.

Nesses casos, a suplementação via sais inorgânicos, ou complexos metálicos, se faz importante para combater o déficit de zinco.

Estudos comparativos (Tabela 2) realizados em novilhas primíparas comparam a administração de sais inorgânicos e quelatos metálicos, demonstrando a vantagem e eficiência do segundo.

Tabela 2. Dados do leite e de sua produção por novilhas primíparas que receberam suplementos contendo metais inorgânicos (IOMs) ou “aminoácidos quelatos” (AACs) em um período de ordenha de até 305 dias.

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

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

* Tabela Modificada da Referência²⁰.

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

O zinco tem importante papel no metabolismo do ácido nucleico e de proteínas, e em processos de divisão celular. É um elemento estrutural ou ativador de uma

série de enzimas, necessário para a adequada formação e funcionamento do sistema imunológico na primeira fase de vida do animal.

1.2.3 - 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*²¹ que ao realizar experimentos com ratos nutridos, essencialmente, com regime lácteo, evidenciou que o cobre era necessário para o combate da anemia ferropriva (80% dessas apresentam, concomitantemente, deficiência de cobre e zinco). Foi demonstrado também, que o cobre era parte 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. Biomoléculas que contêm esse metal são responsáveis por funções primordiais nos organismos vivos como: transporte de elétrons, metabolismo de oxigênio e oxidação de substratos.

Evidencia-se a importância do cobre através de sua quantidade no organismo humano, sendo esse o terceiro elemento de transição em maior abundância, antecedido apenas por ferro e zinco²², conforme podemos observar na Tabela 3.

Tabela 3. Composição elementar média de um adulto de 70kg de peso.

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

Retardo no crescimento, carência protéica, lesões cardiovasculares, aterosclerose, síntese fosfolipídica imperfeita, dermatoses, diminuição da produção de melanina, desmineralização, fraturas e deformações nos ossos, hipercolesterolemia, alterações no metabolismo da tireoide, dores articulares e baixa imunidade são distúrbios relacionados com baixos níveis de cobre²¹.

O conhecimento 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.

O cobre também possui papel importante na produção de cítricos sendo utilizado na forma de sais para controle do cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A Resolução 2 da Comissão Executiva da CANECC (Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico), de 1999, preconiza que o talhão que apresentar uma porcentagem acima de 0,5% de plantas doentes deve ser eliminado por completo. Para teores abaixo de 0,5%, basta eliminar a planta foco e as plantas vizinhas em um raio de trinta metros. Após a erradicação das plantas contaminadas, o restante do talhão deve ser pulverizado com fungicida cúprico em uma concentração de 0,15% de cobre metálico. Na Argentina, país em que a infecção por cancro cítrico é endêmica, recomenda-se a pulverização periódica da plantação em períodos específicos para cada espécie²³.

1.2.4 - Ferro

Trata-se de um dos elementos mais abundantes na Terra e o metal de transição mais abundante no organismo humano²⁴. Embora se apresente insolúvel no meio-ambiente, visto que as moléculas de água presentes no ar ou em soluções aquosas

rapidamente oxidam-no ao estado férrico, este metal nos organismos apresenta-se sempre coordenado com enzimas e outras moléculas orgânicas²⁵.

O ferro possui diversas funções no organismo humano, contudo destaca-se pela importância o seu papel de transportador e armazenador de oxigênio. Apenas na hemoglobina concentram-se em torno de 67% do total de ferro presente no organismo. Outros 10% estão nas moléculas de mioglobina, pigmento vermelho presente nos músculos cuja função é armazenar oxigênio para difusão durante a contração muscular, e nos citocromos²⁵.

Citocromos são enzimas transportadoras de elétrons, caracterizadas pela existência de anéis heme coordenados a átomos de ferro, conferindo a este a função de auxiliar na produção de energia celular (ATP). Outro grupo de citocromos, o P450, localizados especialmente em células hepáticas atuam na degradação de medicamentos, drogas, produtos químicos, toxicantes e substrato endógenos, o ferro está no sítio ativo desses citocromos e através da captação de elétrons ele é capaz de oxidar átomos de oxigênio altamente reativos tornando-os inócuos.

O ferro atua ainda no desenvolvimento neurológico, no sistema imunológico, na síntese de DNA e na função normal do paladar²⁵.

1.2.5 – Paládio e Platina

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo²⁶.

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade²⁶.

Desde o uso clínico da cisplatina, iniciado em 1979, a comunidade científica se esforça para encontrar um análogo desse composto que seja tão potente quanto ele, mas, principalmente, que apresente menos efeitos adversos. Observou-se, notadamente, a partir dos anos 1990 o relato na literatura de muitos trabalhos voltados à síntese de compostos de coordenação sem relação estrutural com a cisplatina, objetivando aplicações antitumorais²⁷.

Entre as centenas de derivados inorgânicos e organometálicos sintetizados e testados contra o câncer até agora, apenas três compostos não contendo platina em suas constituições atingiram a fase II de ensaios clínicos, Figura 3, onde (a) Bis(ciclopentanienil)diclorotitanoceno(IV); (b) KP1019; (c) NAMI-A²⁸.

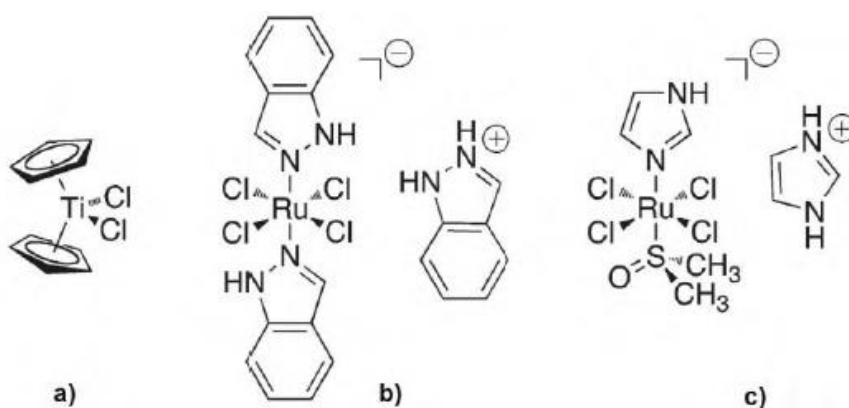


Figura 3. Compostos antitumorais contendo metais de transição distintos da Pt(II).

1.2.6 – Prata

Desde a antiguidade, os íons de prata têm sido reconhecidos por serem eficazes contra microorganismos. Hoje, os íons de prata são usados para controlar o

crescimento bacteriano em uma série de aplicações médicas, incluindo trabalhos odontológicos, cateteres, e na cicatrização de feridas de queimaduras²⁹.

O modo de ação antimicrobiana da prata é multifacetada. Os íons livres de prata Ag^{+2} rompem a membrana reversivelmente a baixas concentrações, provocando o efeito bacteriostático e, irreversivelmente, a altas concentrações, tendo como consequência um efeito bactericida. Os vários mecanismos do efeito da prata dependem da concentração do íon livre de prata Ag^{+2} ²⁹.

M.A. Carvalho et al, estudaram a atividade do complexo de Prata(I) com triptofano ($\text{Ag}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2)$), sintetizado e caracterizado pelos mesmos. Observou-se um halo de inibição de $30.0 \pm 0,1\text{mm}$ frente a *S. aureus*, $24.0 \pm 0,1\text{mm}$ frente *E. faecalis*, $14.0 \pm 0,1\text{mm}$ frente a *E. coli*, e $14.0 \pm 0,1\text{mm}$ frente a *P. aeruginosa*, o que mostra a potencialidade antibacteriana do composto³⁰.

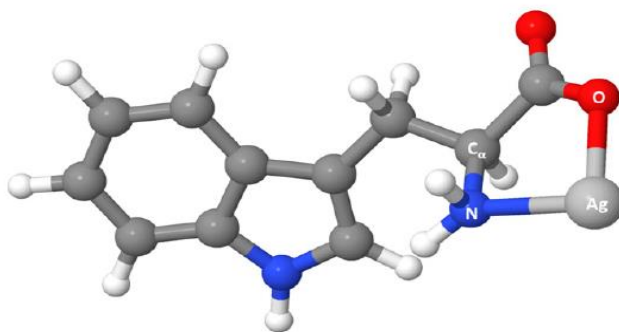


Figura 4. Estrutura proposta para o complexo $[\text{Ag}(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2)]$.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 - Hidrólise Leite A - Hidrólise das proteínas do soro de leite (FCFAR)

A hidrólise das proteínas do soro do leite descritas a seguir foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, no laboratório de Enzimologia, em parceria com o Prof. Dr. Rubens Monti, com auxílio de sua aluna, Dra. Juliana Cristina Bassan.

Obtenção do soro³¹

Primeiramente, adiciona-se 1 litro de leite integral pasteurizado – Tipo B a um banho Maria, juntamente com 6 mL de renina e CaCl_2 (0,5mol/L) por 1 hora à 35°C. Ocorrerá a formação de um coágulo que será cortado em pequenos cubos para a liberação do soro. A massa formada corresponde a caseína, e será filtrada em funil recoberto por gase. De 600 a 700ml de soro de leite são obtidos nesse procedimento.

O soro obtido será submetido à extração de lactose através de diálise, e de gorduras, através de caulim.

Diálise:

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. A diálise é realizada em água destilada, sob refrigeração e constante agitação por um período de dois dias com três trocas de água diárias. Ao final do processo, são retiradas amostras para a dosagem de lactose e proteínas.

Tratamento com caulim³¹

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. Posteriormente, são dosadas as quantidades de lactose, gordura e proteína restantes no soro.

Hidrólise enzimática:

À temperatura de 50°C, adicionou-se ácido Ascórbico ao soro para ajuste do pH em 3. Posteriormente, adicionou-se 0,666mL de solução de pepsina, mantendo-se assim por 20 minutos. Eleva-se o pH a 9,5 utilizando-se hidróxido de amônio, e

adiciona-se 0,666mL de solução de tripsina, deixando-se agir por 10 minutos. Quimotripsina e carboxipeptidase também são adicionadas nas mesmas quantidades das enzimas anteriores, e o meio é deixado em agitação por mais 70 minutos, totalizando assim 2 horas de hidrólise.

II.1.1 - Dosagem de proteína^{32,33}, lactos³⁴ e gordura³⁵:

Método de Lowry - Proteínas totais^{32,33}

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 de íons 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 0,1mol·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- Ciocalteau $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 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 lactose³⁴

A concentração de açúcar redutor (lactose) foi determinada pelo método de Miller³⁷ 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 $\lambda=540\text{ nm}$. 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 Gerber³⁵

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.

II.1.2 - Eletroforese (SDS-PAGE) para separação de proteínas³⁶

Em tubos de microcentrífuga (*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 a diferença entre 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 5). 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 5 (a). O gel é retirado e passa por tratamento com azul de Coomassie Brilhante Blue, que se une às proteínas – ver Figura 5 (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 (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

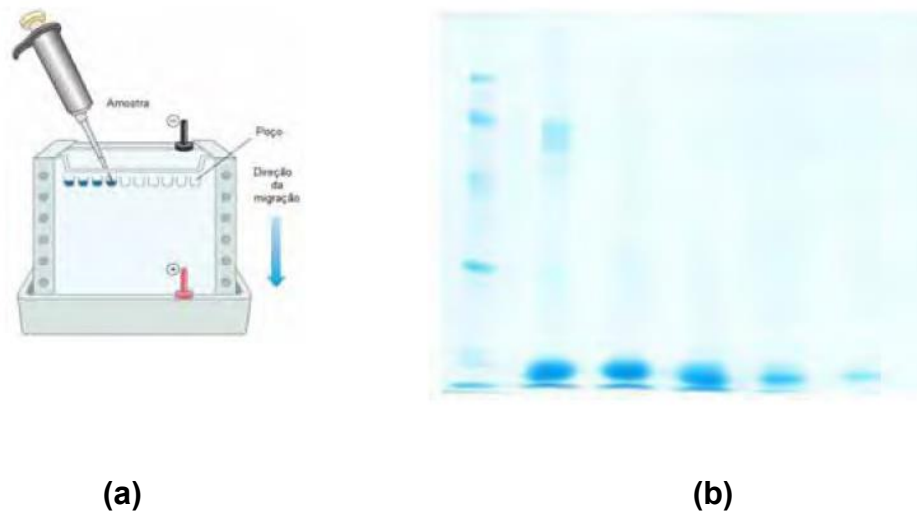


Figura 5. Eletroforese. (a) amostras do soro em diferentes tempos de hidrólise são carregadas nos poços do PAGE. As proteínas movem-se para o interior do gel quando é aplicado um campo elétrico; (b) As proteínas podem ser visualizadas após a eletroforese por tratamento do gel com Comassie Brilliant Blue. Peptídeos pequenos migram para a extremidade inferior do gel.

Ao fim de todos os procedimentos, anteriormente, citados, realizou-se a liofilização do hidrolisado proteico do soro de leite, a fim de se obter um material de mais fácil manipulação.

Para a realização das sínteses foi necessário o cálculo das médias ponderadas dos aminoácidos presentes no soro do leite, a fim de se obter uma massa molar média. O valor obtido foi 132,9 g/mol.

II.2 - Hidrólise Leite B - Hidrólise das proteínas do soro do leite (Unicamp)

A hidrólise das proteínas do soro do leite descrita abaixo foi realizada a fim de se testar uma nova metodologia de hidrólise. O soro de leite utilizado não teve tratamento para retirada de lactose ou gordura.

A hidrólise foi realizada na Unicamp, no Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) em parceria com a Prof^a. Dr^a. Flavia Maria Netto, e sua aluna, a doutoranda Maria Elisa Caetano Silva.

Extração do soro do leite:

Aqueceu-se um litro de leite em um béquer até ficar morno. Acrescentou-se 1-mL de vinagre aos poucos, até a formação de grumos brancos (a caseína). Filtrou-se, retirou-se esse material branco, que foi descartado, armazenou-se o soro em um recipiente de plástico congelando-o posteriormente.

Hidrólise das proteínas do soro de leite:

Após estabilizar a temperatura do recipiente em 50°C, adicionou-se 350mL do soro de leite e calibrou-se o pH Stat para que se mantivesse o pH em 8, utilizando-se hidróxido de sódio 0,5 mol/L. Como o pH inicial do soro de leite apresenta-se por volta de 6, esperou-se até que o pH desejado fosse atingido, e adicionou-se 0,0924g de pancreatina, o que equivale à 4% de enzima, tendo em consideração que temos 0,66% de proteínas no soro do leite. A hidrólise ocorreu durante três horas.

II.3 - Hidrólise C – Torta de linhaça³⁷

A torta de semente de linhaça utilizada neste trabalho foi obtida por Fernanda G. D. Silva do Departamento de Alimentos e Nutrição da Unicamp, e disponibilizada pela Prof^a. Dr^a. Flavia Maria Netto, da mesma instituição.

A metodologia de obtenção do material consistiu no isolamento da proteína, e posterior hidrólise, como descrito a seguir.

Isolamento da proteína:

A linhaça parcialmente desengordurada obtida da Cisbra Lt. Foi desengordurada utilizando hexano, em uma razão 1:3 m/v em temperatura ambiente durante 24 horas, onde o solvente era renovado a cada 6 horas, resultando numa linhaça desengordurada. Para obtenção do isolado proteico, a linhaça desengordurada foi dispersada em água deionizada numa proporção 1:10, ajustou-se o pH para 9 com solução de NaOH 1N, e deixou-se a mistura em agitação em temperatura ambiente por 1 hora, procedendo-se após esse tempo com uma centrifugação. O processo de extração foi repetido. Posteriormente, o pH foi ajustado para 4,2 com uma solução de HCl 1N e a proteína precipitada foi centrifugada, lavada 3 vezes com água acidificada em pH 4,2 e suspensa em água deionizada onde o pH foi novamente ajustado para 6. O isolado proteico foi liofilizado e mantido à – 20°C.

Hidrólise:

O isolado proteico foi hidrolisado utilizando-se a enzima Alcalase, à 60°C por 180 minutos. O pH foi mantido adicionando-se solução de NaOH 0,25N utilizando-se um titulador automático. A reação foi finalizada aquecendo-se o meio à 90°C por 10 minutos, inativando-se assim, a enzima. O hidrolisado foi liofilizado.

II.4 – Sínteses**II.4.1 – Cobre****Composto HACul**

Em um béquer de 100 mL, solubilizou-se 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. Por fim, adicionou-se, gota a gota, uma suspensão constituída de 15 mL de metanol, 5 mL de água, 1,1 mmol do hidrolisado A (produto da hidrólise A) e 1,2 mmol de NaOH (0,0480g) até 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 lavado com etanol e água gelados. Para esta rota a razão metal ligante foi igual a 1metal: 2,2 ligante.

Composto HACuI

Em um béquer de aproximadamente 100 mL, solubilizou-se 64,92 mmol (8,6279 g) do hidrolisado A em 20 mL de água. Ajustou-se o pH para 12,0 através da adição de hidróxido de sódio e transferiu-se para um frasco de Schlenk. Em seguida, sob atmosfera de N₂, adicionou-se lentamente solução aquosa salina contendo 29,32 mmol (7,0849 g) de Cu(NO₃)₂. Observou-se a mudança de cor da solução para verde, seguida da formação de sólido amarelo que foi rotulado como amostra **HACuI**. O tempo total de síntese foi de 30 minutos, após a qual, realizou-se uma filtração sob atmosfera inerte 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 desaerado. Por ser bastante instável ao oxigênio atmosférico, o sólido foi armazenado em ampola de vidro selada a vácuo. Para esta rota a razão metal ligante foi igual a 1metal: 2,2 ligante.

Composto HACuII

Em um béquer de aproximadamente 100 mL, solubilizou-se 0,2046 g do hidrolisado A em 30 mL de etanol. 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. Lavou-se o sólido com etanol gelado. O precipitado da síntese resultou em uma massa de 0,1910 g e foi rotulado como amostra **HACuIII**.

Composto HACuIV

À uma solução contendo 4,775g do hidrolisado A e 20mL de água foi adicionado hidróxido de sódio até pH 12. Adicionou-se, posteriormente, uma solução contendo 2,749g de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (proporção de 3,6:1 – hidrolisado:metal). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética. A dispersão final foi centrifugada, o precipitado verde musgo formado filtrado à vácuo, e lavado com água. Deixou-se o sólido em temperatura ambiente para secagem por algumas horas, e realizou-se análise por espectrometria na região do infravermelho.

Compostos HACuV e HACuVI

Em um béquer de 50mL pesou-se 0,127g do hidrolisado A, o qual foi diluído em 15mL de metanol e 5mL de água destilada, e teve seu pH ajustado para 9 com NaOH. Em outro béquer, 0,124g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram diluídos em 10mL de dimetilformamida e sobre a solução foram gotejados 4mL de metanol. Uma alíquota de 15mL foi retirada da solução de soro e posta no frasco do equipamento de micro-ondas, e posteriormente, gotejou-se alíquota de 10mL da solução do sal sobre o hidrolisado. A mistura permaneceu no equipamento por 30 minutos à temperatura de 100°C, sem agitação (proporção da síntese: 2,2:1 – hidrolisado:metal).

Esta síntese foi realizada novamente, diferindo-se da primeira no modo de adição do sal ao hidrolisado, sendo desta vez, apenas vertido. Agitou-se previamente a mistura reacional por 2 minutos, e logo após foram irradiadas à temperatura de 100°C, **HACuV** por 10 minutos e **HACuVI** por 30 minutos.

As soluções resultantes das três sínteses foram centrifugadas e os precipitados foram filtrados, lavados com água destilada, secos ao ar por algumas horas e analisados por espectrometria na região do infravermelho.

Compostos HCCuI, HCCuII, HCCuIII e HCCuIV

As sínteses de **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII** foram realizadas através de método de difusão, e **HCCuIV** foi obtido a partir de síntese em micro-ondas.

O ponto de partida de todas as sínteses foi a pesagem de 0,127g de hidrolisado proteico de linhaça e sua diluição em 5mL de água destilada, seguido da adição de 15mL de metanol (**HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIV**) ou 15mL de dimetilformamida (**HCCuIII**). O pH das suspensões foi ajustado para 9 com adição de NaOH. Foram preparadas separadamente três soluções com 0,124g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e uma solução com 0,0852g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, todas solubilizadas em DMF (proporção de todas as síntese foi de 2,2:1 – hidrolisado:metal).

Adicionou-se por gotejamento, 4mL de metanol sobre cada uma das três suspensões metanólicas e, em um delas foi adicionado também a solução de cloreto de cobre, essa síntese foi nomeada como **HCCuII**. Em um segundo béquer, foi adicionada uma das soluções de sulfato de cobre, dando origem à síntese **HCCuI**. Sobre a suspensão constituída de DMF foi adicionada outra das soluções de sulfato de cobre, resultando na síntese **HCCuIII**. Por fim, a última das soluções de sulfato

de cobre foi adicionada diretamente sobre uma das suspensões metanólicas, e a mistura levada ao equipamento de microondas a 100°C, durante 30 minutos, com pré-agitação programada para 2 min. Essa síntese foi nomeada como **HCCuIV**.

As sínteses **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII** foram seladas com Parafilm e levadas à geladeira, onde permaneceram em repouso por quinze dias, ao final dos quais foram filtradas a vácuo e os precipitados formados submetidos a lavagem com água destilada. A síntese **HCCuIV** passou por centrifugação após a reação em microondas para a separação do precipitado formado, esse ainda foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada. Todos os produtos isolados foram submetidos, após secagem ao ar, a análise por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Os precipitados exibiram mudanças na coloração com relação aos precursores, apresentando tons de verde que variaram de verde-bandeira ao verde bastante escuro.

II.4.2 - Ferro

Compostos HAFel, HAFell, HAFelll, HBFel, HBFell e HBFelll

Uma solução contendo 5 mL de água destilada e 0,1g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi vertida em uma solução de 0,5g do hidrolisado X, solubilizados em 20mL de água destilada (proporção da síntese 5:1 – hidrolisado:sal). A mistura reacional foi, então, alocada no frasco do micro-ondas. No equipamento, a solução sofreu 2 minutos de pré-agitação e em seguida foi irradiada com as ondas de micro-ondas, à temperatura de 100°C, por Y minutos (sendo X e Y descritos abaixo para cada síntese).

HAFel: X = hidrolisado A e Y = 2,5minutos

HAFelI: X = hidrolisado A e Y = 10 minutos

HAFelIII: X = hidrolisado A e Y = 30 minutos

HBFeI: X = hidrolisado B e Y = 2,5 minutos

HBFeII: X = hidrolisado B e Y = 10 minutos

HBFeIII: X = hidrolisado B e Y = 30 minutos

As soluções foram centrifugadas, os precipitados filtrados, lavados com água destilada, secos ao ar por algumas horas e analisados por espectrometria na região do infravermelho. Os sobrenadantes foram divididos, uma parte foi coberta e armazenada sobre a bancada e a outra foi congelada.

II.4.3 – Cobalto

Composto HACol

O composto **HACol**, de cor rosa claro, foi obtido através de duas metodologias diferentes: síntese convencional, e hidrotérmica.

A síntese convencional foi realizada adicionando-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} em 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,282 g do hidrolisado A até pH 11. Em seguida, a solução resultante foi gotejada sobre 5 mL de uma solução aquosa contendo 0,152 g de cloreto de cobalto(II) hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a temperatura ambiente (25°C). A mistura de cor vermelha obtida foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos, e, posteriormente, filtrada à vácuo, lavada com água e etanol gelado, e seca à temperatura ambiente.

A síntese hidrotérmica foi realizada adicionando-se uma aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L^{-1} em uma solução aquosa contendo 0,147 g de hidrolisado A, até pH 12,0. Em seguida, o hidrolisado foi adicionado à 16mL de uma solução aquosa

contendo 0,714 g de cloreto de cobalto(II) hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A mistura reacional obtida foi, então, transferida para o reator, e submetida a tratamento solvotérmico por 24 h a 90 °C.

Após esse tempo, a mesma foi resfriada lentamente até atingir 27 °C a uma taxa de resfriamento igual a 0,1 °C/min. A suspensão vermelha obtida foi filtrada a vácuo, separando traços de um sólido rosa impregnado no papel de filtro, que foi descartado. O sobrenadante, após dias de repouso sobre a bancada, foi filtrado a vácuo, lavado com etanol gelado e seco ao ar na temperatura ambiente.

O rendimento da síntese convencional foi de 18%, e o da hidrotérmica 25%.

Composto HACoII

O composto **HACoII** de coloração marrom foi obtida com 23% de rendimento também via síntese hidrotérmica. O procedimento utilizado foi o mesmo do composto HACoI, modificando-se apenas o precursor utilizado que, neste caso, foi 0,457 g de nitrato de cobalto(II) hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Composto HACoIII

O composto **HACoIII** de cor rosa salmão foi obtido por rota convencional, adicionando-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ em 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,282 g do hidrolisado A até pH 11. Em seguida, a solução resultante foi gotejada sobre 5 mL de uma solução aquosa contendo 0,115 g de sulfato de cobalto(II) heptahidratado ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), à temperatura ambiente (25 °C) e sob agitação magnética por 30 minutos. Posteriormente, filtrou-se à vácuo, lavou-se com água e etanol gelado, e secou-se à temperatura ambiente.

O rendimento da reação para a obtenção do composto HACoIII foi de 43%.

II.4.4 – Zinco

Composto HAZnI

O composto HAZnI de cor amarelo mostarda foi obtido pela rota hidrotérmica, adicionando-se uma solução aquosa contendo 0,147 g de hidrolisado A à uma solução aquosa contendo 0,447 g de nitrato de zinco hexahidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A mistura reacional obtida foi, então, transferida para o reator, e submetida a tratamento solvotérmico por 24 h a 90 °C.

Após esse tempo, a mesma foi resfriada lentamente até atingir 27 °C a uma taxa de resfriamento igual a 0,1 °C/min. A suspensão vermelha obtida foi filtrada a vácuo, separando traços de um sólido rosa impregnado no papel de filtro, que foi descartado. O sobrenadante, após dias de repouso sobre a bancada, foi filtrado a vácuo, lavado com etanol gelado e seco ao ar na temperatura ambiente.

O rendimento da reação do composto HAZnI foi de 15%.

Composto HAZnII

O composto HAZnII de cor amarelo mostarda foi obtido por rota hidrotérmica, seguindo-se as mesmas etapas do composto HAZnI, apenas modificando-se o precursor utilizado que, neste caso, foi o cloreto de zinco (ZnCl_2).

O rendimento da reação para a obtenção do composto HAZnII foi de 13%.

Composto HAZnIII

O composto HAZnIII de cor amarelo mostarda foi obtido por síntese convencional adicionando-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ em 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,282 g do hidrolisado A até pH 11. Em seguida, a solução resultante foi gotejada sobre 5 mL de uma solução aquosa contendo 0,409 g de cloreto de zinco (ZnCl_2) a temperatura ambiente (25 °C), deixando-se sob

agitação magnética por 30 minutos, e, posteriormente, filtrada à vácuo, lavada com água e etanol gelado, e seca à temperatura ambiente.

O rendimento foi de 16%.

II.4.5 – Paládio

Todas as sínteses envolvendo sais de paládio foram realizadas pela metodologia convencional.

Composto HAPdI

Adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,0483 g do hidrolisado A à uma solução contendo 15 mL de acetona e 0,0311 g do precursor $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, onde a razão molar L:M é de 3:1.

Ao adicionar-se o hidrolisado, observou-se o escurecimento da solução, tornando-se castanha. Em seguida, a solução tornou-se amarela, com uma pequena quantidade de um precipitado de cor preta. Após ser mantida em agitação por 1 hora, filtrou-se a solução para retirada do precipitado, cobriu-se o béquer e deixou-se evaporar o solvente. Após a evaporação, observou-se a formação do precipitado preto novamente.

Composto HAPdII

Sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,0483 g de hidrolisado A à uma solução contendo 8 mL de acetona e 0,0311 g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, onde a razão molar L:M é de 3:1.

Ao adicionar-se o hidrolisado, observou-se o escurecimento da solução, tornando-se castanha. Em seguida, a solução tornou-se amarela, com a rápida formação de uma alta quantidade de precipitado preto.

Composto HAPdIII

Adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,0483 g de hidrolisado A à uma solução contendo 7 mL de acetona e 0,0155 g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, onde a razão molar L:M é de 6:1.

A solução tornou-se primeiramente castanha, mudando para amarela em seguida. No decorrer da reação, houve formação de um precipitado amarelo, que escureceu com o decorrer do tempo, tornando-se preto.

Composto HAPdIV

Adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,0483 g de hidrolisado A à uma solução contendo 7 mL de acetona e 0,0155g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, onde a razão molar L:M é de 6:1.

A solução tornou-se castanha com a adição do hidrolisado e, posteriormente, amarela, com formação de um precipitado amarelo. Logo após a formação do precipitado, a solução foi filtrada, porém, mesmo assim, o precipitado tornou-se preto.

Composto HAPdVI

Adicionou-se uma solução aquosa contendo 0,0483 g de hidrolisado A à uma solução contendo 15 mL de acetona e 0,0311 g do precursor $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ onde a razão molar L:M é de 3:1.

Posteriormente, foi adicionada uma solução contendo 10 mL de acetona e 0,0156g de fenantrolina.

Adicionou-se o hidrolisado muito lentamente a solução de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, porém antes, e depois, da adição da fenantrolina, houve formação do precipitado preto.

II.4.6 - Platina

Composto HBPl

Em um béquer de aproximadamente 200mL, em agitação e à temperatura ambiente, adicionou-se uma solução contendo 0,0130g de hexacloroplatinato e, aproximadamente, 5mL de água à 5mL do hidrolisado **B**.

Após uma hora de agitação, a solução apresentou-se com uma coloração amarela. Não houve formação de precipitado, então liofilizou-se o composto, obtendo-se um material também amarelo. Enviou-se para análise.

II.4.7 - Prata

Composto HBAgl

Em um béquer de aproximadamente 200mL, em agitação e à temperatura ambiente, adicionou-se uma solução contendo 0,0130g de AgNO_3 e, aproximadamente, 5mL de água à 5mL do hidrolisado **B**.

Após uma hora de agitação, a solução apresentou-se com uma coloração rósea. Não houve formação de precipitado, então liofilizou-se o composto, obtendo-se um material também róseo. Enviou-se para análise..

II.5 - Aminograma

A análise de aminoácidos do hidrolisado A foi realizada no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli via método de derivatização pós-coluna com OPA (orto-ftalaldialdeído) em um analisador Shimadzu LC-10A/C-47A.

O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido, e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra. A detecção foi realizada por um detector de fluorescência acoplado ao sistema com comprimento de excitação de 350 nm e comprimento de emissão igual a 450 nm.

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

II.6 - Análise de teor de metal

A quantificação de metal foi realizada nos compostos mais promissores, através de espectrometria de absorção atômica, com lâmpadas de cátodo oco de cobre e de ferro em triplicata.

II.7 - Análise de proteínas e teor de aminoácidos

II.7.1 - Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi feita pelo método de Kjeldahl. O objetivo é determinar o teor total 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 amônia. Em um sistema fechado, o sulfato de amônia 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 do 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

Pegou-se por volta de 0,6g de soro de leite, 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 de 20 a 25mL de ácido sulfúrico concentrado nos tubos de digestão e em seguida, foram colocados no bloco digestor à cerca de 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 N), até o ponto de viragem (o ácido bórico 2% foi utilizado como indicador).

Cálculos

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

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

$$\text{Proteína: } \text{P} = \text{NT} \times \text{Fator}$$

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

II.8 – Ensaio de resistência a complexos de cobre

Em colaboração com a Prof^a. 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).

Metodologia utilizada³⁸

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.

Condições de estocagem³⁸

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

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 - Hidrólise A

III.1.1 - Dosagem de açúcar redutor no soro do leite hidrolisado via processo enzimático

Para a dosagem de açúcar redutor, utilizou-se o método de Miller³⁴. A curva de calibração utilizada, para posterior determinação da concentração de açúcar redutor no soro do leite, foi de lactose como apresentada na Figura 6. O coeficiente de extinção molar para a lactose, a partir da curva, apresentou valor igual a $290 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

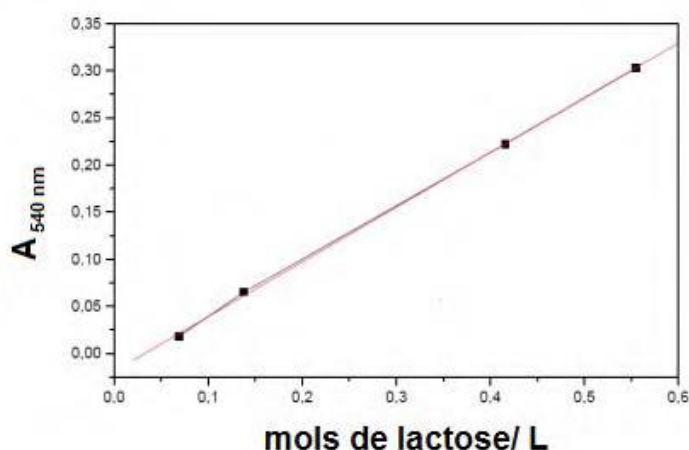


Figura 6. Curva padrão da lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.

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; ε = 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 5, 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 4 apresenta os valores obtidos nas dosagens.

Tabela 4. Quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.

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

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 4 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.

III.1.2 - Dosagem de proteína³³

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 Hartree³³. A Figura 7 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 (g proteína/ L)-1 para o coeficiente de extinção.

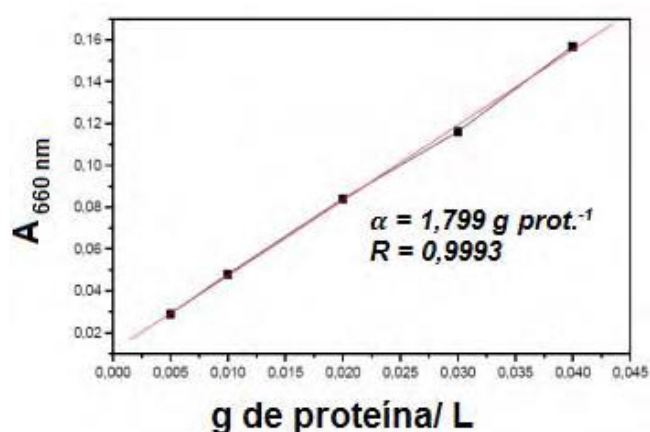


Figura 7. Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos com as dosagens de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

Tabela 5. Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

Amostra de soro	g/L
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 5 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 consequentemente 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 literatura⁴¹. 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 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.

III.1.3 - Eletroforese do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato³¹

Os resultados obtidos com as eletroforeses (Figura 8) 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).

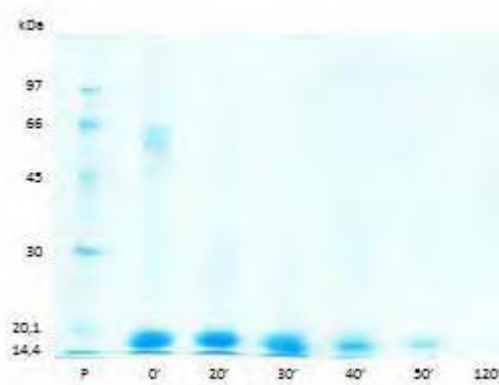


Figura 8. SDS-PAGE do produto de hidrólise da pepsina, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 20 minutos; coluna 4: 30 minutos; coluna 5: 40 minutos; coluna 6: 50 minutos; coluna 7: 120 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.

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 semelhantes¹.

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 consequentemente a concentração dos maiores peptídeos da amostra³⁹.

III.1.4 - Aminograma do hidrolisado A

O aminograma do hidrolisado A está representado na Figura 9 enquanto que o aminograma padrão segue representado na Figura 10.

A derivatização é um procedimento químico onde os grupos carboxílicos e aminos pertencentes aos aminoácidos reagem com OPA para formar isoindoles altamente fluorescentes⁴⁰.

Em geral, juntamente com OPA são utilizadas substâncias que possuem em sua estrutura o componente sulfidril como, por exemplo, o 2-ME, o 3-MPA ou sulfito de

sódio, os quais favorecem a formação de adutos hidrofóbicos do OPA com aminoácidos primários⁴¹. Após a formação de derivados, a separação dos aminoácidos ocorre através de uma coluna de fase reversa. De acordo com os aminogramas, conclui-se que a amostra **hidrolisado A** contém aminoácidos livres, tais como o Asp, Pro, Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Lys e Arg confirmados pelos seus respectivos picos em comparação ao aminograma padrão.

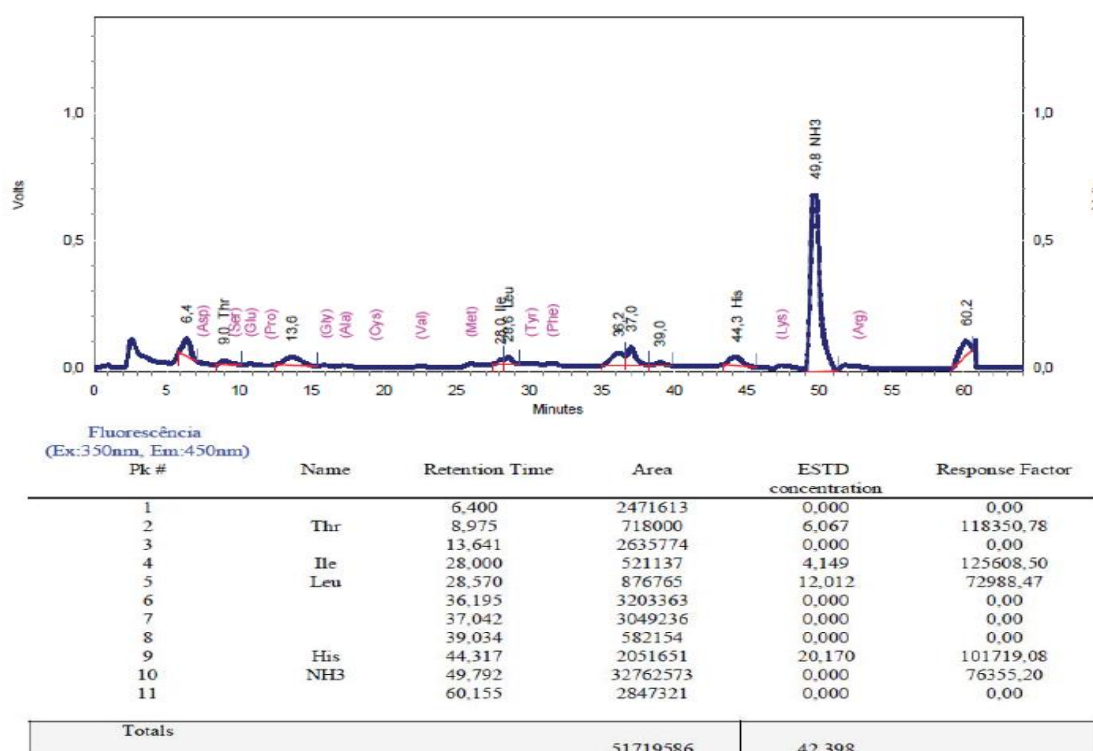


Figura 9. Aminograma obtido do soro hidrolisado A.

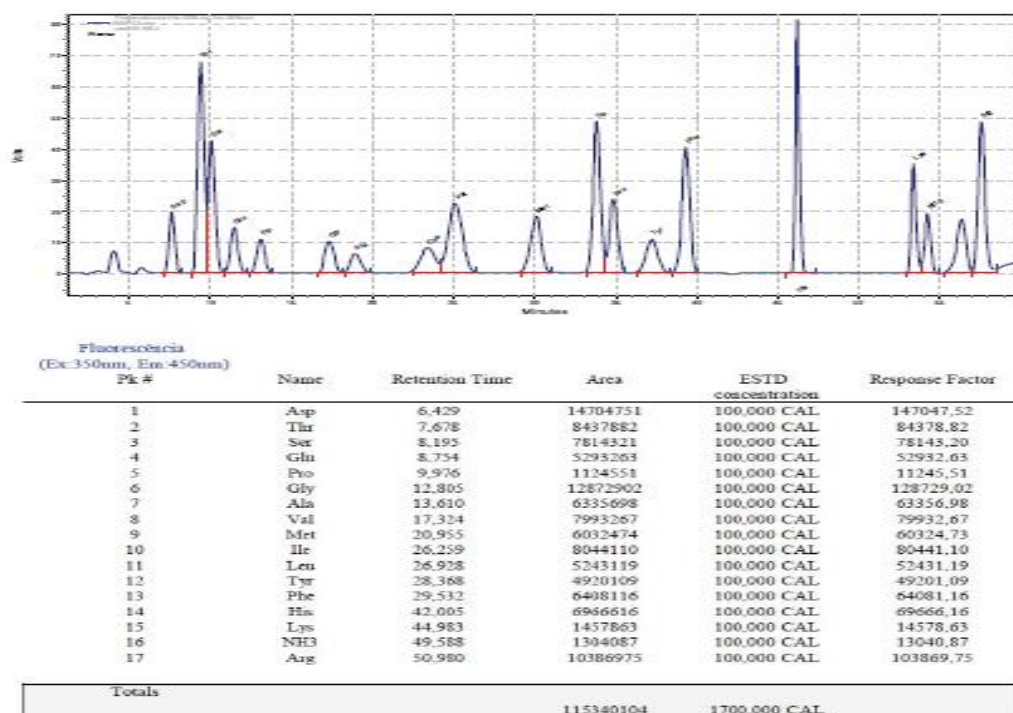


Figura 10. Aminograma padrão.

III.1.5 - Infravermelho das proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise e do hidrolisado A

A Figura 11 apresenta dois espectros vibracionais no IV (cm^{-1}), onde o primeiro refere-se às proteínas do soro do leite sem sofrer hidrólise enzimática e o segundo, refere-se ao soro do leite liofilizado e hidrolisado enzimaticamente (hidrólise A) cujas frequências e atribuições estão na Tabela 6.

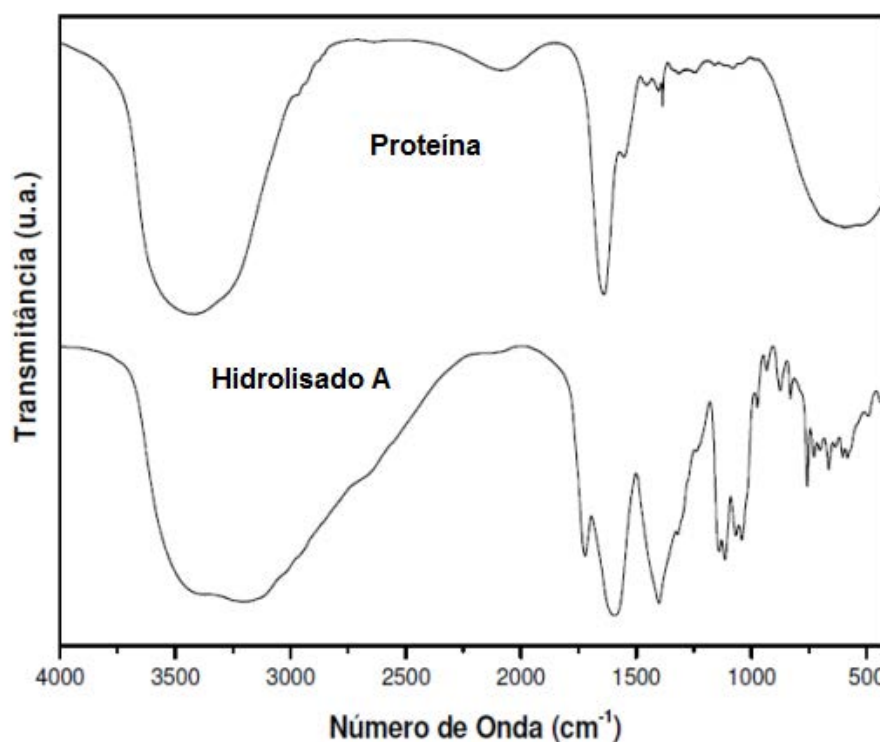


Figura 11. Espectros vibracionais no IV do soro do leite antes (Proteína) e depois da hidrólise (Hidrolisado A).

Tabela 6. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho do soro antes da hidrólise (Proteína) e depois da hidrólise (Hidrolisado A), e suas respectivas atribuições.

Proteína	Hidrolisado A	Atribuição
3423 F,I	3360 F,I	ν OH
3261 om	3202 F,I	ν NH
2969 om	2950 om	ν CH
-	1721 m	ν C=O
1638 F	-	Amida I
1551 f	1594 F,I	Amida II + ν_{as} COO ⁻ ,
1404 f	1401 F,I	ν_s COO ⁻
1317 f	1320 om	ν CC
1116 f	1140 m + 1115 m	ν C-O
1077 f	1067 m + 1042 m	ν C-O + ν CN + δ C-H
1034 f	974 mf	ν CC + ν CN

-	875 mf – 830 mf	δ C-H
-	757 f	ν CC
-	728 f	ρ CH ₂
-	665 f	ρ OH
592 F,I	605 f – 583 f	δ COO ⁻
498 F,I	490 f	ω OH + ω CH ₂
-	427 f	δ CCC

No espectro vibracional do soro *in natura* (**Proteína**) observa-se a presença das duas principais bandas referentes à presença de ligações amida: amida I (1638 cm⁻¹) e amida II (1551 cm⁻¹). A região do espectro compreendida entre 1800 e 800 cm⁻¹ é muito importante para a análise de materiais proteicos, uma vez que neste intervalo se observam as absorções do grupo amida (CONH) presente nas ligações peptídicas das proteínas, sendo as bandas amida I e amida II os dois modos de vibrações mais importantes do grupo amida. A absorção referente ao modo vibracional amida I é observada, em geral, no intervalo de 1655-1644 cm⁻¹ que apresenta contribuição principalmente do modo de estiramento da ligação C=O, enquanto que o modo de vibração amida II é esperado no intervalo de 1591-1530 cm⁻¹ associado aos movimentos de deformação N-H e estiramento C-N. A observação destas bandas no espectro no IV do soro *in natura* confirma, então, a presença de polipeptídeos (proteínas) no soro do leite.

Por outro lado, a análise do espectro vibracional do hidrolisado do soro nesta mesma região possibilitou a identificação das bandas em 1721, 1594, 1401 e 1140-1067 cm⁻¹ associadas, respectivamente, aos modos vibracionais ν C=O, ν_{as} COO⁻, ν_s COO⁻ e ν C-O.

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

Analisando as bandas no espectro vibracional do hidrolisado do soro (**Hidrolisado A**) em região de alta energia, observa-se a presença de uma banda forte e larga na região de 3700 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} onde estão compreendidas as absorções referentes aos movimentos vibracionais νOH (3360 cm^{-1}), νNH (3202 cm^{-1}). O estiramento νCH em 2950 cm^{-1} pode ser atribuído ao grupo $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$, o qual depende de cada aminoácido. O fato dela se apresentar alargada deve-se muito provavelmente a formação de ligações de hidrogênio do tipo $\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$. É importante ressaltar que a hidrólise enzimática das proteínas é dependente de uma série de fatores, tais como fonte de proteína, tipo de enzima utilizada (por exemplo, uma enzima ácida com a pepsina ou básica como a alcalase), pH, etc. tornando assim muito difícil a identificação dos produtos finais da hidrólise.

III.2 - Hidrólise B

A Figura 12 mostra os espectros vibracionais do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise **B**, e a Tabela 7 mostra as principais frequências vibracionais no IV do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise **B**.

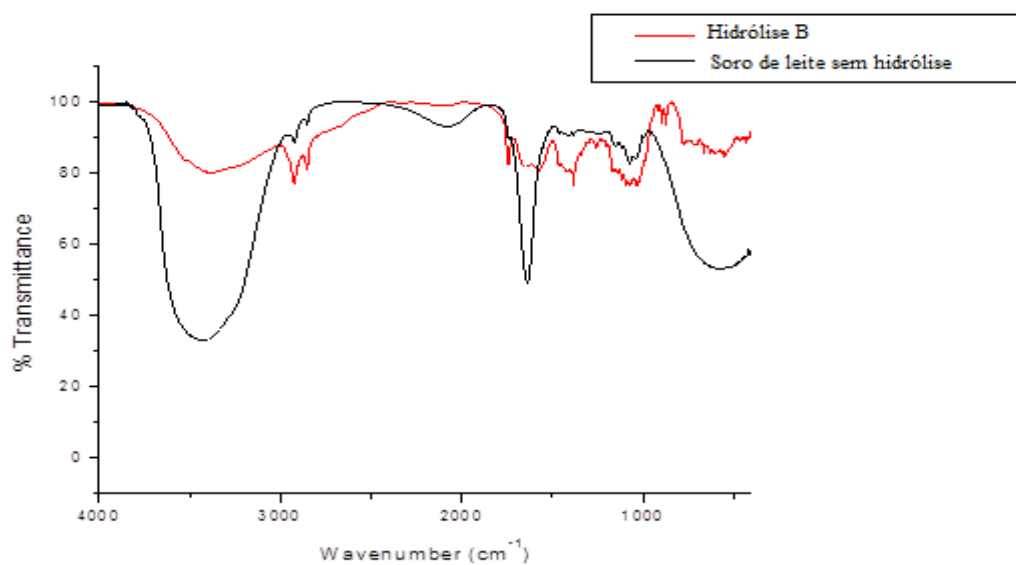


Figura 12. Espectros vibracionais no IV do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise B.

Tabela 7. Principais frequências vibracionais no IV do soro de leite sem hidrólise e da hidrólise B.

Hidrólise B	Atribuição
3382 <i>mf</i>	νOH
3288 <i>mf</i>	νNH
2923 <i>m</i>	νCH
1744 <i>m</i>	$\nu\text{C=O}$
1416 <i>f</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1116 <i>f</i>	$\nu\text{C-O}$
1072 <i>m</i>	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
1035 <i>f</i>	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 <i>f</i>	$\delta\text{C-H}$
690 <i>f</i>	ρCH_2
668 <i>f</i>	ρOH
565 <i>f</i>	δCOO^-
523 <i>f</i>	$\omega\text{OH} + \omega\text{CH}_2$

Mais nitidamente pode-se perceber a quase extinção da banda correspondente às amidas I (1637 cm^{-1}), II (1555 cm^{-1}), demonstrando, novamente, a quebra das ligações peptídicas, ou seja, a efetividade da hidrólise. Outro ponto que demonstra a hidrólise é o surgimento da banda de $\nu\text{C=O}$ em 1744 cm^{-1} no espectro do hidrolisado. Nota-se que o diferencial feito pelo controle maior de temperatura e pH resultou numa hidrólise mais efetiva.

III.2.1 - Análise de proteínas

A análise de proteínas realizada no ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) resultou em uma porcentagem de 0,67% de proteína no soro de leite analisado, resultado este que está de acordo com os dados da literatura⁴².

III.3 – Sínteses

III.3.1 – Cobre

Composto HACul

A Figura 13 contempla o espectro vibracional na região do infravermelho do quelato de cobre(II) (HACul), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 8.

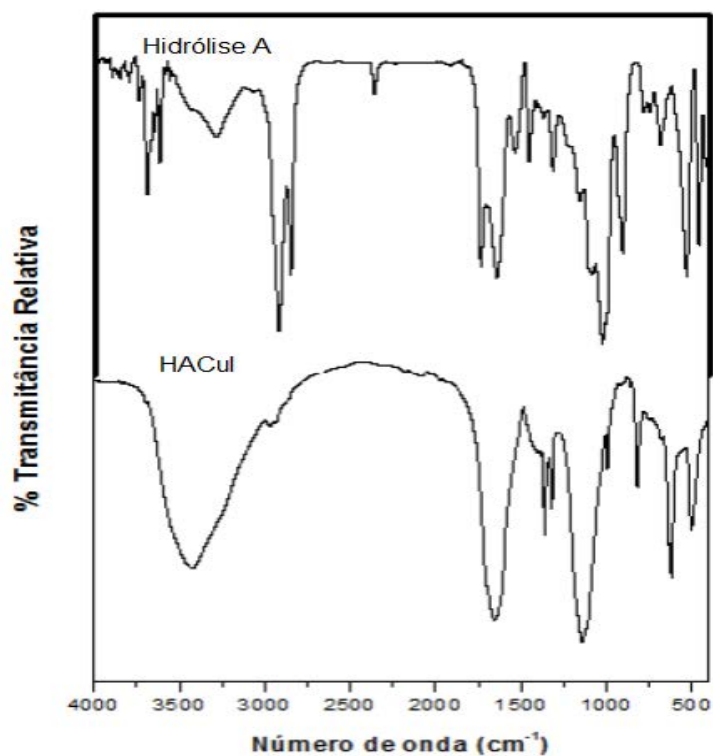


Figura 13. Espectros vibracionais no IV dos compostos HACul e Hidrólise A (em pastilhas de KBr).

Tabela 8. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm⁻¹) referentes aos compostos HACul e Hidrólise A e suas respectivas atribuições^{43, 44}

HACul	Hidrólise A	Atribuição
-	3695 m, 3624 f	νOH
3143 F, 3228 om	3450 – 3206 f	H_2O
2968 mf, 2928 mf	2924 F, 2824 F	νNH
-	1744 F	$\nu\text{C=O}$
1953 F	1646 F	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
-	1543 f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1362 m	1464 m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
-	1374 mf	δCH_2
1323 m	1322 m	νCC
1140 MF	-	SO_4^{-2}
-	1157 f, 1094 om	νCN

-	1027 MF	δNH_3^+
-	915 F	$\nu \text{CC} + \nu \text{CN}$
990 mf	-	δNH
820 m	-	δOCO
749 mf	755 mf	νCC
681mf	694f	ρOH
627 F	-	SO_4^{-2}
506 m	541 F	δOCO
-	470F	waggingOH +
-	427 f	δCCC

Para o composto **HACul** sugere-se a coordenação via grupos –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 δOCO tem seu seus valores alterados de 541 cm^{-1} (ligante livre) para 506 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 cm^{-1} . Salienta-se também, neste caso, a presença de íons sulfato.

Composto HACulI

A Figura 14 contempla os espectros vibracionais na região do infravermelho do soro hidrolisado (**Hidrólise A**) e do quelato de cobre(I) (amostra **HACulI**), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 9.

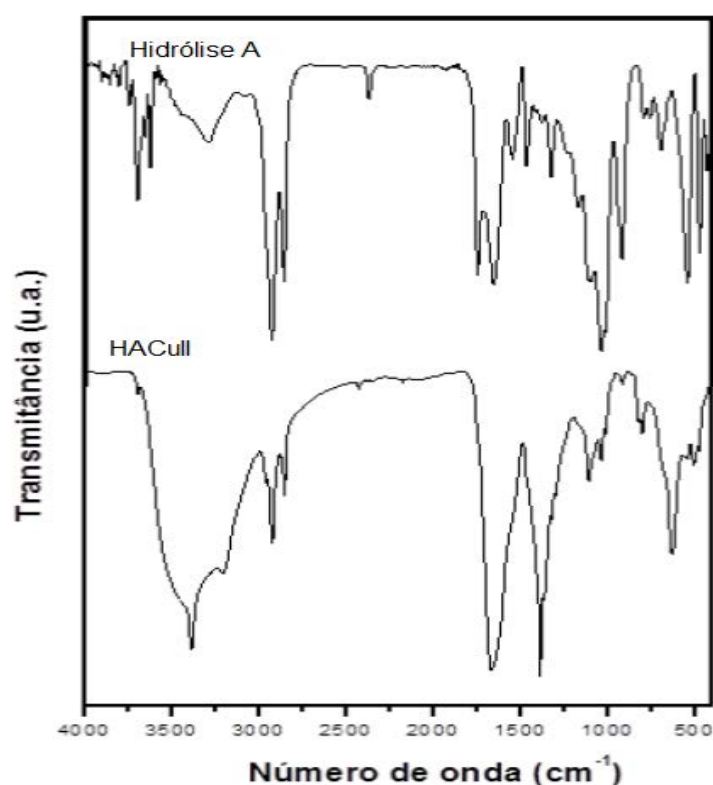


Figura 14. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm⁻¹) referentes aos compostos HACuII e Hidrólise A e suas respectivas atribuições.

Tabela 9. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm⁻¹) referentes aos compostos HACuII e Hidrólise A e suas respectivas atribuições^{43, 44}

HACuII	Hidrólise A	Atribuição
-	3695 m, 3624 f	νOH
3391 MF, 3206 f	3450 – 3206 f	H_2O
2922 m, 2851 m	2924 F, 2824 F	νNH
-	1744 F	$\nu\text{C=O}$
1660 MF	1646 F	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
-	1543 f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1382 MF	1464 m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
-	1374 mf	δCH_2
1318 mf	1322 m	νCC
1290 mf	-	$\nu\text{CN} + \delta\text{NH} + \delta\text{O=C-N}$

1104 f	1157 f, 1094 om	νCN
1026 f	1027 MF	δNH_3^+
914 mf	915 F	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
799 mf	755 mf	νCC
626 F	694 f	ρOH
549 mf	541 F	δOCO^-
470 mf	470 m	waggingOH +
-	427 f	δCCC

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

Para o grupo $\text{C}=\text{O}$, a presença do $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1744 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 δOCO muda de 541 cm^{-1} para 549 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 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 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.

Composto HACuIII

A Figura 15 contempla os espectros vibracionais na região do infravermelho do soro hidrolisado liofilizado (**Hidrólise A**) e do quelato de cobre(II) (amostra **HACuIII**), cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 10.

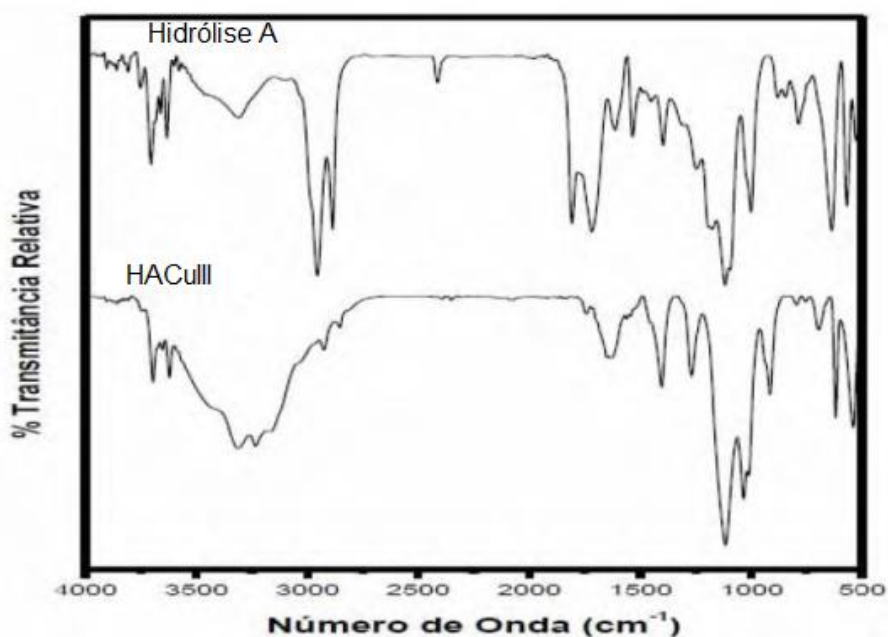


Figura 15. Espectros vibracionais no IV dos compostos HACuIII e Hidrólise A.

Tabela 10. Principais frequências vibracionais no espectro IV (cm⁻¹) referentes aos compostos HACuIII e Hidrólise A e suas respectivas atribuições^{43, 44}

HACuIII	Hidrólise A	Atribuição
3691, 3627 f	3695 m, 3624 f	νOH
3313m, 3228 m	3450 – 3206 f	H_2O
2921 mf, 2850 mf	2924 F, 2824 F	νNH
1743 mf	1744 F	$\nu\text{C=O}$
1632m	1646 F	$\delta_{\text{as}}\text{NH}_3^+$
1560mf	1543 f	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1404	1464 m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$

-	1374 mf	δCH_2
-	1322 m	νCC
1268 m	-	$\nu\text{CN} + \delta\text{NH} + \delta\text{O}=\text{C}-\text{N}$
1119 MF	-	SO_4^{-2}
-	1157 f, 1094 om	νCN
1026 F	1027 MF	δNH_3^+
915 m	915 F	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
753 m	755 mf	νCC
696 f	694 f	ρOH
618 m	-	SO_4^{-2}
538 m	541 F	δCOO^-
469 m	470 m	wagging OH +
428 f	427 f	δCCC

Ao compararmos os espectros do material hidrolisado **A** e do composto **HACuIII** concluímos que o grupo O-H do primeiro não coordenou ao metal, pois os valores para os νOH permanecem praticamente idênticos.

Em relação ao grupo C=O, observamos a ausência de variação nos valores comparativos do $\nu\text{C}=\text{O}$ para o composto obtido e o material hidrolisado; além disso, os valores da δCOO^- permanecem próximos a 540 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 νNH 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 NH^{+3} (1027 e 1646 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 **HACuIII**.

Compostos HACuXI

A Figura 16 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho para o hidrolisado A, e para o composto **HACuIV**., cujas frequências e atribuições estão na Tabela 11.

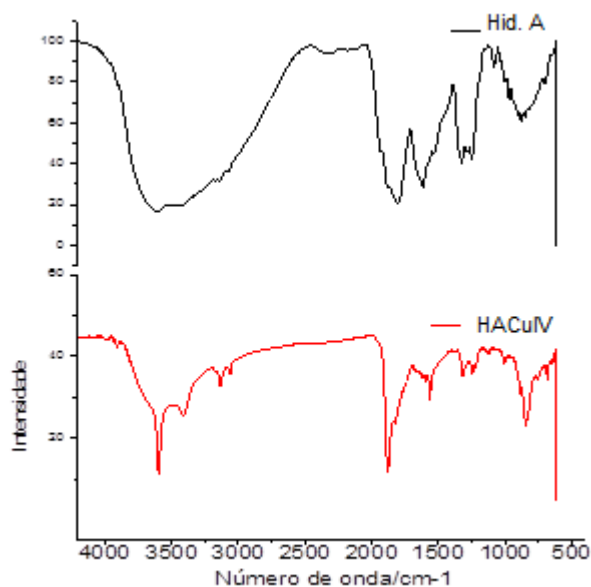


Figura 16. Espectros vibracionais na região do infravermelho da **hidrólise A**, e do composto **HACuIV**.

Tabela 11. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da **hidrólise A**, e do composto **HACuIV**.

Hidrólise A	HACuIV	Atribuições
3394 F	3388 F	νOH
3268 F, 3197	3202 m	νNH
1727 f	-	$\nu\text{C=O}$

1671 m	1668 F	δNH_2
1595 F	-	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1401 F	1347 f	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1112 m, 1036	1105 mf, 1034	$\nu\text{C-O}$

Através das frequências e atribuições relacionadas na Tabela 11, é possível inferir que haja coordenação em ambos compostos através de grupos carboxílicos devido aos deslocamentos em $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ e $\nu\text{C-O}$, além da ausência de $\nu\text{C=O}$ e de $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$. Existem ainda deslocamentos em νNH e alteração na intensidade de $\delta(\text{NH}_2)$ o que sugere coordenação por grupos amino também.

Compostos **HACuV** e **HACuVI**

A Figura 17 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos **HACuV** e **HACuVI**, cujas frequências e atribuições estão na Tabela 12.

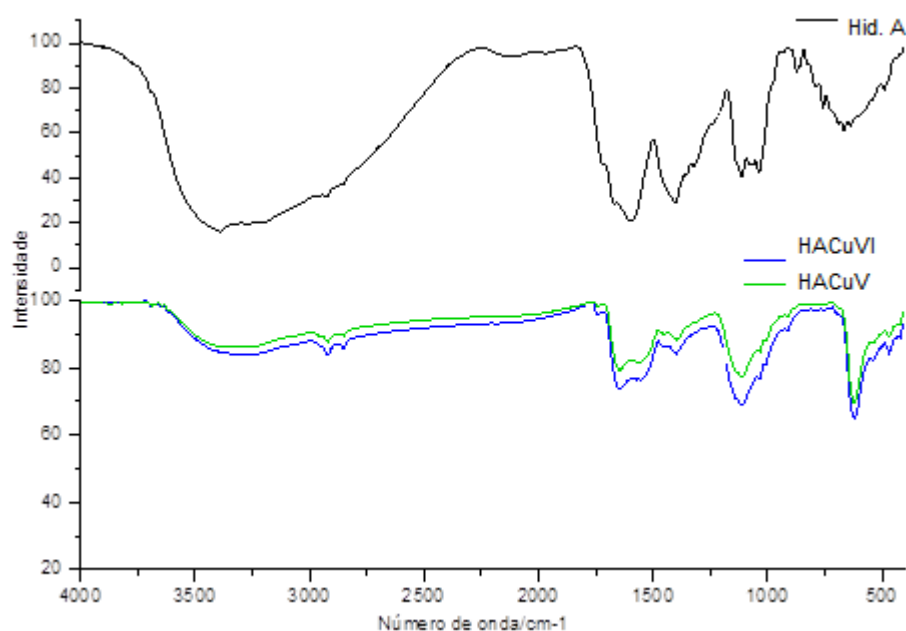


Figura 17. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e dos compostos HACuV e HACuVI.

Tabela 12. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HACuV e HACuVI

Hidrólise A	HACuV e HACuVI	Atribuições
3394 F – 3268 F	3390 f	νOH
3197 F	3253 f	νNH
1727 f	1744 f/mf	$\nu\text{C=O}$
1671 m	1643 F	$\delta(\text{NH}_2)$
1595 F	1555 F	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1401 F	1405 m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1112 m – 1036 m	1108 m – 1032 m/f	$\nu\text{C-O}$
-	620 m	SO_4^{2-}
490 f	538 f	δOCO

Os espectros analisados são bastante parecidos, diferindo apenas na intensidade das principais bandas. Todos parecem estar coordenados tanto por grupos carboxílicos quanto por grupos amina, sendo possível observar deslocamento de bandas em νNH e $\delta(\text{NH}_2)$ (referentes aos grupos amina) e em $\nu\text{C=O}$, $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, $\nu\text{C-O}$ e δOCO (referentes aos grupos carboxilatos) ambos indicando a presença de quelato. Pode-se perceber uma grande diminuição na intensidade de νOH e ausência de um dos seus desdobramentos (de 3394 F – 3268 F no soro B para 3390 f nos três compostos) sugerindo que a água não tem grande papel na coordenação.

O tempo de reação não influenciou no composto formado, e portanto, a síntese via radiação microondas é capaz de conduzir à formação do composto em apenas dois minutos e meio. Tal comportamento é esperado uma vez que a principal vantagem desse método de síntese é aumentar a velocidade das reações.

Composto **HBCuI**

A Figura 18 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto **HBCuI**, cujas frequências e atribuições estão na Tabela 13.

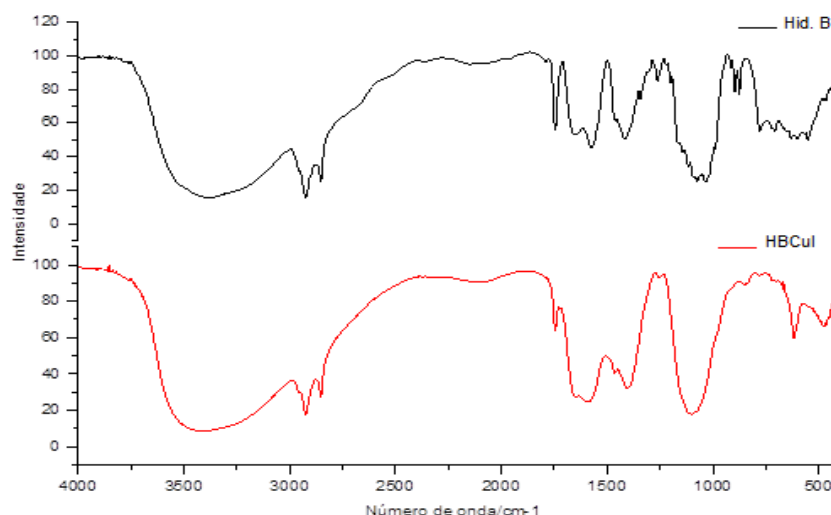


Figura 18. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto HBCul.

Tabela 13. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto HBCul.

Hidrólise B	HBCul	Atribuições
3383 F	3383 F	ν OH
1743 m	1747 f	ν C=O
1654 m	1654 m	Amida I
1574 m	-	Amida II
-	1586 F	ν_{as} COO ⁻
1414 m	1462 m, 1405 m	ν_s COO ⁻
1072 F, 1032 F	1100 F	ν C-O

As frequências e atribuições listadas na Tabela 13 permitem inferir que o composto **HBCul** possui diferentes coordenações envolvendo os grupos carboxílicos, observa-se deslocamentos em ν C=O, ν_s COO⁻ e ν C-O, além da ausência da banda amida II e aparecimento da banda ν_{as} COO⁻, indicando a

presença do quelato. O desdobramento da banda $\nu_s\text{COO}^-$ é o que permite inferir a presença de mais de um tipo de coordenação.

COMPOSTOS **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII** E **HCCuIV**.

A Figura 19 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise C, e dos compostos **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII** E **HCCuIV**. As principais bandas observadas nos espectros vibracionais e atribuições estão listadas na Tabela 14.

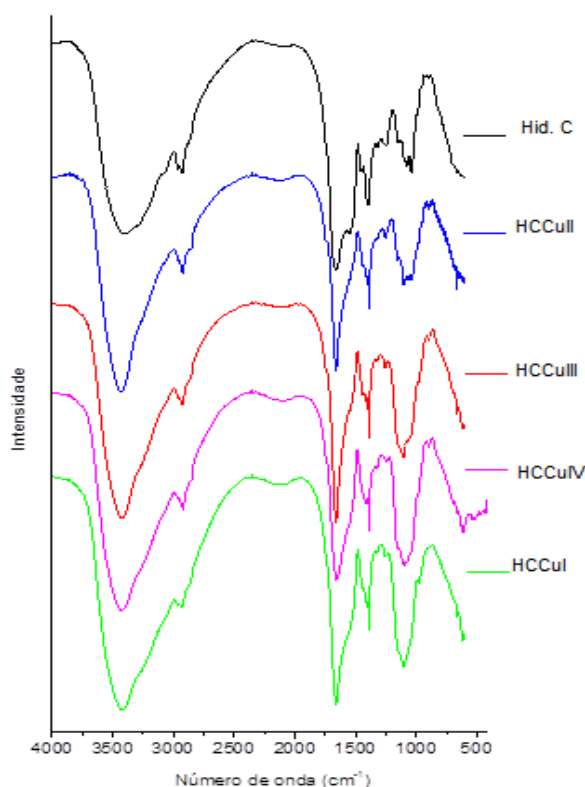


Figura 19. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise C, e dos compostos **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII** E **HCCuIV**.

Tabela 14. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise, e dos compostos HCCUI, HCCUII, HCCUIII E HCCUIV.

Hidrólise C	HCCuII	HCCuIII	HCCuI V	HCCuI	Atribuições
3402 F	3434 F	3426 F	3426	3421	νOH
3281 F	3259 m	3281 F	3278 F	3281 F	νNH
-	1745 f	1740 f	1734 f	-	$\nu\text{C=O}$
1658 mF	1658 mF	1658 mF	1655 mF	1658 mF	Amida I
1552 F	1552 m	1552 m	1552 m	1552	Amida II
1399 m	1383 m	1383 m	1383 m	1388 m	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1074 m –	1100 m	1105 m	1100 F	1105 F	$\nu\text{C-O}$

Houve deslocamento da banda νNH entre o hidrolisado de linhaça e os compostos **HCCuII** e **HCCuIV** o que pode indicar coordenação através do nitrogênio dos grupos amino. Quanto aos grupos carboxila, apesar de não haver variação considerável da banda $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$, há deslocamento em $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ e em $\nu\text{C-O}$, o que demonstra a possibilidade de um tipo de coordenação por esses grupos. O desaparecimento do desdobramento em $\nu\text{C-O}$ para o composto **HCCuI** reafirma essa possibilidade. Uma hipótese para a falta de deslocamento na banda $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ e a variação relativamente pequena em outras bandas é o excesso de ligante não coordenado que poderia ter sofrido precipitação juntamente com o quelato, influenciando o resultado da análise.

III.3.2 – Ferro

Compostos HAFel, HAFell e HAFelll

A Figura 20 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos **HAFel**, **HAFell** e **HAFelll**. As principais bandas observadas nos espectros vibracionais e atribuições estão listadas na Tabela 15.

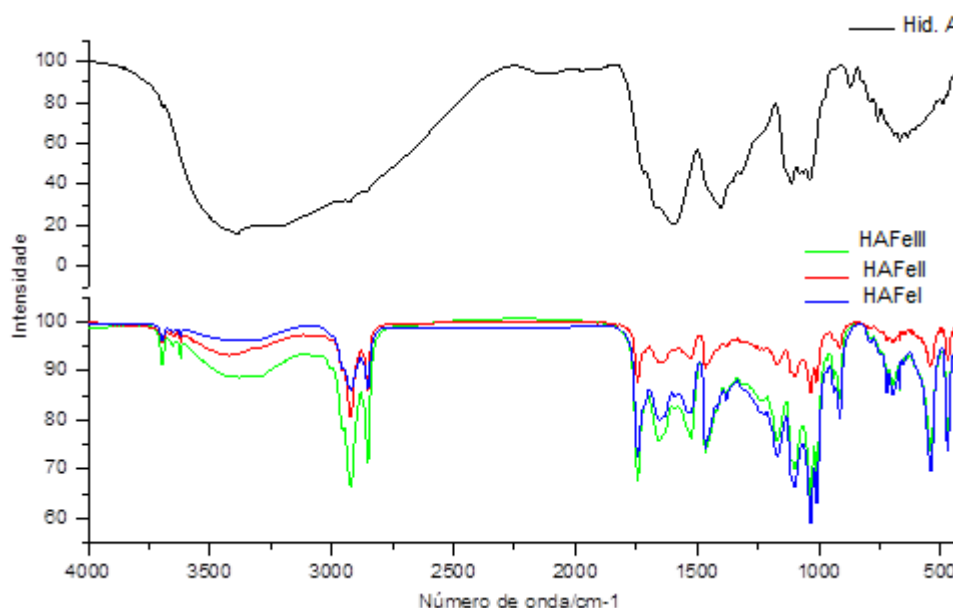


Figura 20. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HAFel, HAFell e HAFelll.

Tabela 15. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A, e dos compostos HAFel, HAFell e HAFelll.

Hidrólise A	HAFel, HAFell e HAFelll	Atribuições
3394 F	3434 f	vOH
3268 F, 3197 F	3289 f	vNH
1727 f	1743 F	vC=O
1671 m	1654 m	δNH ₂

1595 F	1526 m, 1465 m	$\nu_{as}COO^-$
1401 F	1377 mf	ν_sCOO^-
1112 m, 1036 m	1032 F, 1008 F	$\nu C-O$

Os espectros dos três compostos (HAFelX, HAFex e HAFexI) são bastante semelhantes, variando somente em intensidade das bandas. Pode-se perceber uma diminuição brusca da intensidade das bandas referentes a νOH nos espectros dos compostos em comparação com o hidrolisado A, esse aspecto aliado aos deslocamentos das bandas de $\nu C=O$, ν_sCOO^- , e $\nu C-O$ indica coordenação no grupos carboxílicos. Deslocamentos ocorrem ainda em νNH e $\delta(NH_2)$ sugerindo quelação também por grupos amina.

Compostos HBFel, HBFell e HBFelll

A Figura 21 ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B, e dos compostos **HBFel**, **HBFell** e **HBFelll**. As principais bandas observadas e suas atribuições estão listadas na Tabela 16.

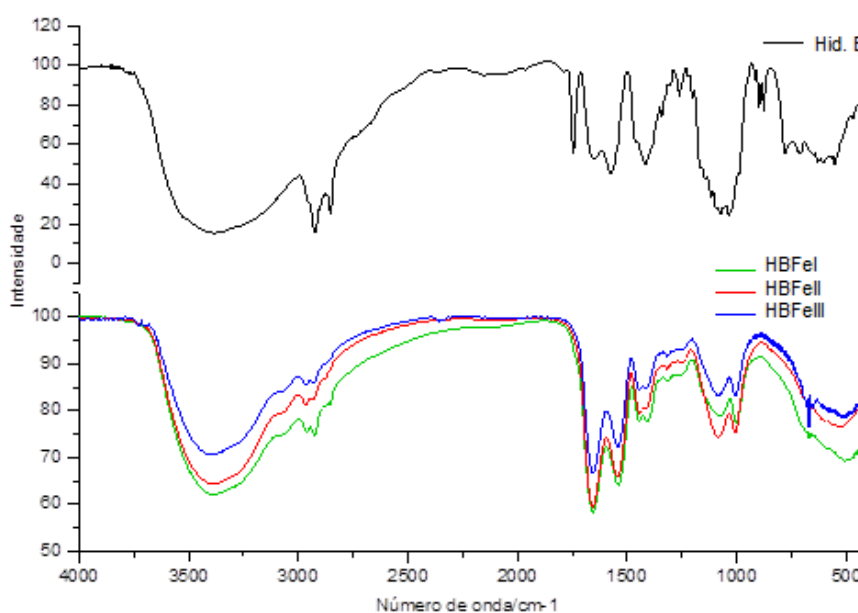


Figura 21. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B, e dos compostos **HBFel**, **HBFeII** e **HBFeIII**.

Tabela 16. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B, e dos compostos **HBFel**, **HBFeII** e **HBFeIII**.

Hidrólise B	HBFel, HBFeII e HBFeIII	Atribuições
3383 F	3394 F	νOH
-	-	νNH
1743 m	-	$\nu\text{C=O}$
1654 m	1654 F	Amida I
1574 m	1538 m	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1414 m	1446 f – 1405 f	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1072 F – 1032 F	1081 f – 1004 f	$\nu\text{C-O}$

Os três compostos analisados apresentaram espectros de IV muito semelhantes, variando apenas a intensidade das bandas. O deslocamento nas

bandas $\nu_{as}COO^-$, ν_sCOO^- , e $\nu C-O$, evidenciam a coordenação pelos grupos carboxílicos. O desdobramento em ν_sCOO^- indica a possibilidade de mais de um modo de coordenação realizado pelo grupo. A banda νNH referente aos grupos amina encontra-se oculta pelas bandas de νOH e νCH tanto no espectro do hidrolisado B quanto nos compostos analisados, no entanto a banda $\delta(NH_2)$ não sofreu alteração, indicando que os grupos amina não participam da quelação do ferro nesse caso.

III.3.3 - Cobalto

COMPOSTO HACol

A Figura 22 apresenta os espectros vibracionais no IV do composto **HACol** e do hidrolisado A cujas frequências e atribuições estão na Tabela 17.

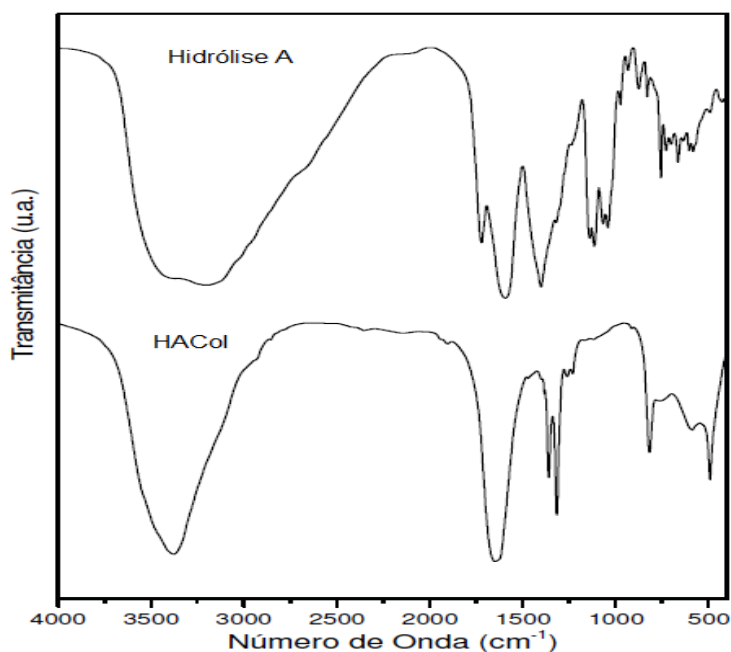


Figura 22. Espectros vibracionais na região do infravermelho do Hidrolisado A e do composto **HACol**.

Tabela 17. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente ao hidrolisado A e o composto HAcCoI e suas respectivas atribuições.

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

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

Nesta amostra, o grupo carboxilato também é outro sítio de coordenação do hidrolisado proteico ao centro metálico. Evidências claras de coordenação são observadas no espectro de **HACol** pela ausência das bandas associadas aos modos de estiramento C=O (1721 cm^{-1}) e C-O ($1140\text{--}1067\text{ cm}^{-1}$), assim como pelo surgimento da banda $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ em 1645 cm^{-1} e deslocamento da $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (1401 no hidrolisado livre para 1360 cm^{-1}). Todas essas evidências espectrais ainda permitem inferir modo de coordenação bidentado para o grupo carboxilato nessa amostra.

Composto HAColI

A Figura 23 apresenta os espectros vibracionais no IV do composto **HAColI** e a do hidrolisado A cujas frequências e atribuições estão na Tabela 18.

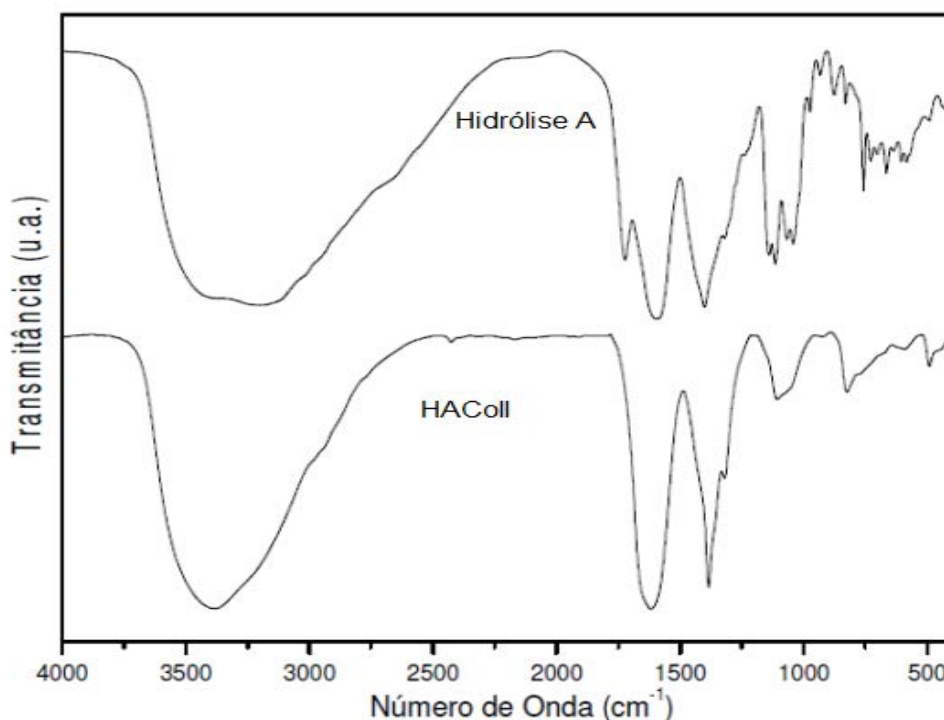


Figura 23. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto **HAColI**.

Tabela 18. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente à hidrólise A e ao composto HAColl e suas respectivas atribuições.

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

A coordenação do hidrolisado proteico ocorreu no composto **HAColl** via grupo funcional carboxilato, já que não foi observada a banda referente ao modo $\nu\text{C=O}$ (1721 cm^{-1}), além das bandas associadas aos movimentos $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ e $\nu\text{C-O}$ terem sido deslocadas quando comparadas com aquelas presentes no espectro do hidrolisado livre. Foi observada, ainda, a presença do grupo nitrato na amostra, cujas frequências são praticamente as mesmas que aquelas observadas no

espectro vibracional do material de partida permitindo inferir que esse grupo no composto **HACoII** deve estar atuando apenas como um contra-íon.

Cabe destacar ainda que, a banda associada a um dos movimentos do grupo nitrato (NO_3^-) ocorre na mesma região que aquela referente ao modo $\nu_s\text{COO}^-$ do grupo carboxilato (1382 e 1376 cm^{-1} , respectivamente), o que dificultou a identificação desse modo nessa amostra. De qualquer modo, a observação da banda atribuída ao modo de deformação angular do carboxilato (δCOO^-) e a diversos modos da cadeia orgânica permitem concluir que ambos os grupos NH_2 e COO^- são pontos de coordenação do hidrolisado proteico ao íon cobalto.

Composto HACoIII

A Figura 24 apresenta os espectros vibracionais no IV do composto **HACoIII** e do hidrolisado A cujas frequências e atribuições estão na Tabela 19.

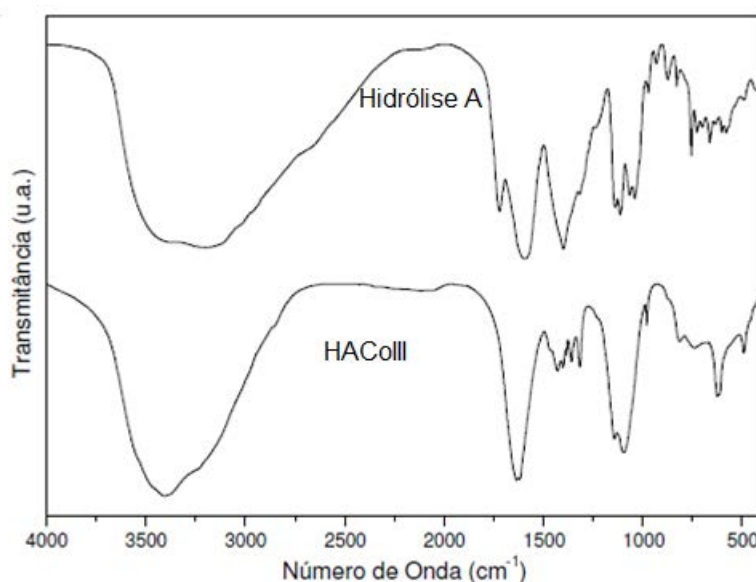


Figura 24. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto **HACoIII**.

Tabela 19. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente a hidrólise A, ao composto HACoIII e suas respectivas atribuições.

Hidrólise A	HACoIII	Atribuições
3360 F, I	3407 F, I	νOH
3202 F, I	3234 om	νNH
2950 om	2857 om	νCH
1721 m	-	$\nu\text{C=O}$
1594 F, I	1625 F, I	$\delta \text{H}_2\text{O} + \nu_{\text{as}}\text{COO}^- +$
1401 F, I	1429 f – 1405 f	$\nu_{\text{s}}\text{COO}$
1320 om	1315 f	νCC
1140 m – 1115 m	1145 om, 1103 F	$\nu\text{C-O} + \nu\text{SO}_4^{-2}$
1067 m – 1042 m	1096 F, I	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta \text{C-H}$
974 mf	983 f	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 mf – 830 mf	881 om – 817 f	$\delta \text{C-H}$
757 f	744 om	νCC
728 f	-	ρCH_2
665 f	626 om	ρOH
605 f – 583 f	613 m – 570 om	$\delta \text{COO}^- - \delta \text{SO}_4^{-2}$
490 f	459 om	waggingOH –
427 f	-	δCCC

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

Comparando as frequências vibracionais no IV do composto **HAClIIIV** com a do hidrolisado proteico, observamos uma banda na região de 3800 a 2800 cm^{-1} onde é possível atribuímos aos movimentos vibracionais de estiramentos νOH , νNH e νCH que, quando comparadas ao hidrolisado A encontra-se mais fina e deslocada, significando, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio, e sim, da coordenação com o íon cobalto, permitindo assim, inferir coordenação do sítio NH_2 ao metal.

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

III.3.4 - Zinco

Composto HAZnI

A Figura 25 apresenta os espectros vibracionais no IV do composto **HAZnI** e da hidrólise A, cujas frequências e atribuições estão na Tabela 20.

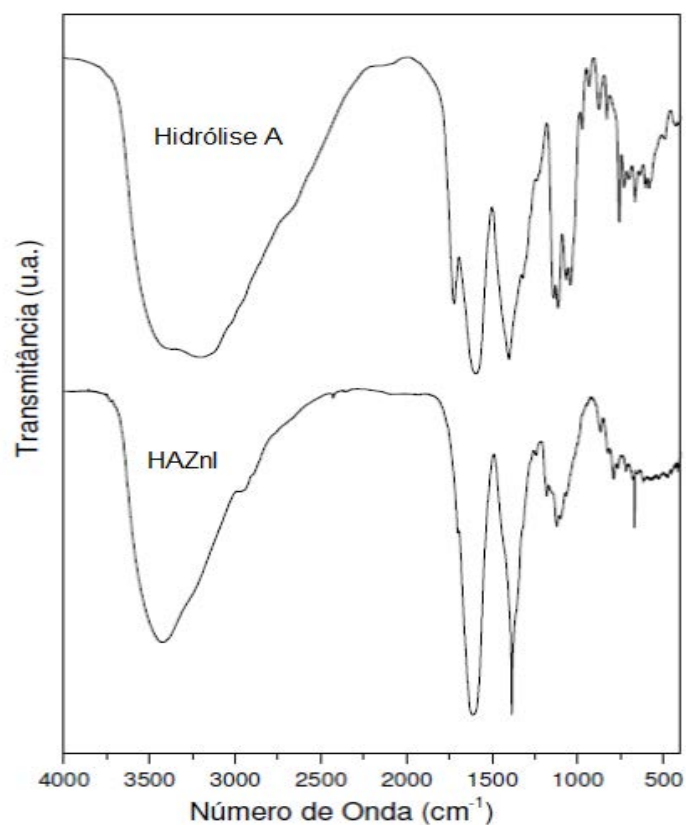


Figura 25. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto **HAZnI**.

Tabela 20. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente à hidrólise A e ao composto HAZnI, e suas respectivas atribuições.

Hidrólise A	HAZnI	Atribuição
3360 F,I	3430 F,I	νOH
3202 F,I	-	νNH
2950 om	2945 om	νCH
1721 m	-	$\nu\text{C=O}$
-	1617 F	$\nu_{\text{as}}\text{COO}$
1594 F,I	-	$\delta\text{H}_2\text{O} + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2$
1401 F,I	1384 F	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^- + \nu_{\text{as}}\text{NO}_3^-$
1320 om	1316 m	νCC
-	1244 m	Amida III
1140 m – 1115 m	1152 f – 1122 m	$\nu\text{C-O}$
1067 m – 1042 m	1044 m – 1065 m	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$

974 mf	-	$\nu_{CC} + \nu_{CN}$
875 mf – 830 mf	821 f	$\delta \text{ C-H} + \delta \text{ NO}_3^-$
757 f	790 m	ν_{CC}
728 f	705 m	ρ_{CH_2}
665 f	687 m – 674 m	ρ_{OH}
605 f – 583 f	579 f	$\delta \text{ COO}^-$
490 f	478 m	waggingOH +
427 f	-	$\delta \text{ CCC}$

Comparando as frequências vibracionais no IV do composto **HAZnl** com as do hidrolisado proteico, observamos que a banda na região de 3600 a 3000 cm^{-1} , onde é possível atribuímos aos movimentos vibracionais de estiramentos ν_{OH} , ν_{NH} e ν_{CH} , encontra-se mais fina e deslocada no composto, em comparação a do hidrolisado A. Isso significa, portanto, que o átomo de nitrogênio não participa mais das ligações de hidrogênio e sim da coordenação com o íon zinco, permitindo assim, inferir coordenação do sítio NH_2 ao metal.

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

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

Composto HAZnII

A Figura 26 apresenta os espectros vibracionais no IV do composto **HAZnII** e a do hidrolisado proteico A, cujas frequências e atribuições estão na Tabela 21.

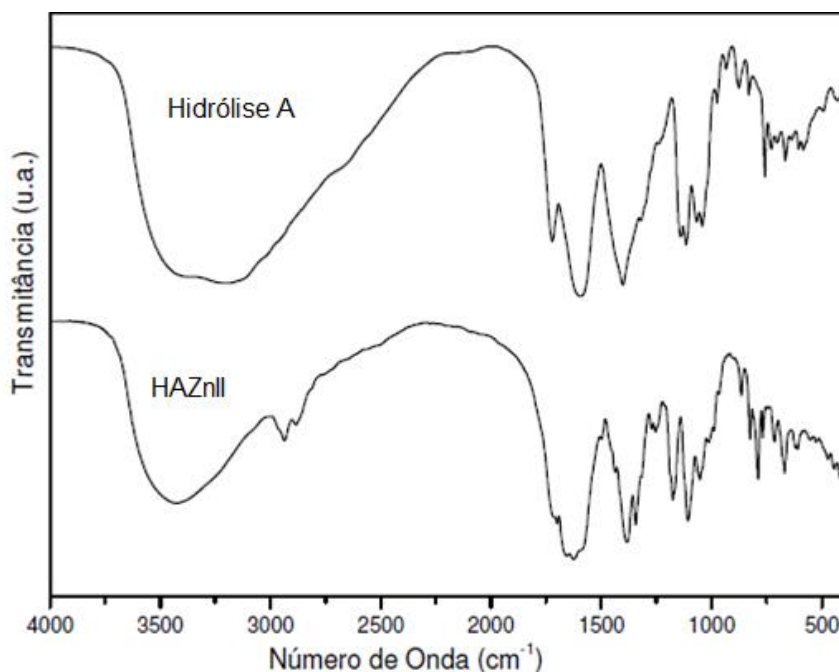


Figura 26. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise A e do composto **HAZnII**.

Tabela 21. Frequências vibracionais na região do infravermelho referente a hidrólise A e ao composto HAZnII, e suas respectivas atribuições.

Hidrólise A	HAZnII	Atribuições
3360 F,I	3431 F,I	ν OH
3202 F,I	-	ν NH
2950 om	2936 m – 2884 m	ν CH
1721 m	1701 f	ν C=O
-	1654 F,I – 1625	Amida I + ν_{as} COO
1594 F,I	1592 F	Amida II + δ H ₂ O +
1401 F,I	1384 F – 1343 F	ν_s COO
1320 om	1317 m	ν CC
-	1270 m + 1254 m	Amida III
1140 m – 1115 m	1174 F,I + 1106	ν C-O

1067 m – 1042 m	1052 m	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta\text{C-H}$
974 mf	987 f	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 mf – 830 mf	864 f	$\delta\text{C-H}$
757 f	788 F – 766 m	νCC
728 f	713m	ρCH_2
665 f	668 m	ρOH
605 f – 583 f	592 f	δCOO^-
490 f	431 m	waggingOH +
427 f	417 m	δCCC

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

Composto **HAZnIII**

A Figura 27 apresenta os espectros vibracionais do IV das amostras **HAZnIII** e da hidrólise A, cujas frequências e atribuições estão na Tabela 22.

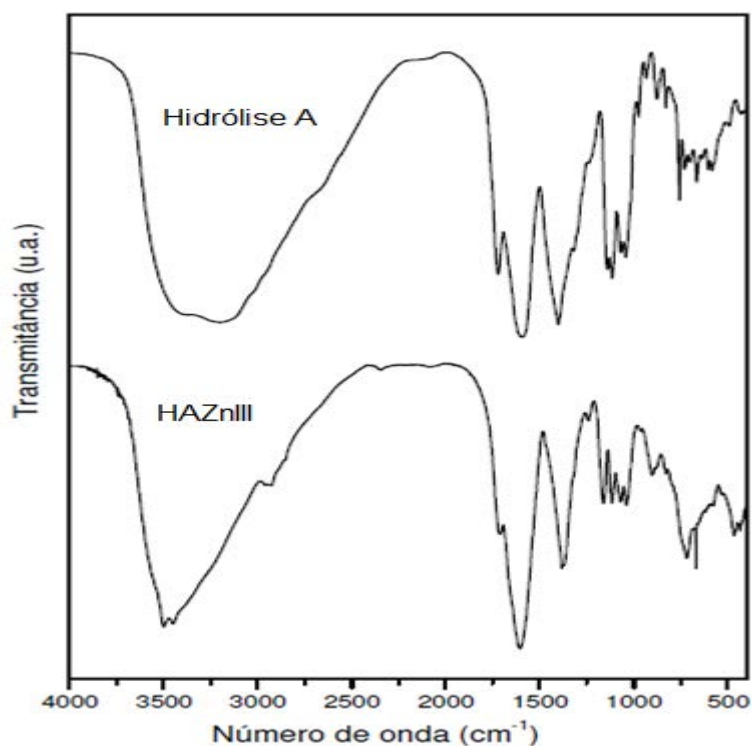


Figura 27. Espectros vibracionais na região do infravermelho do composto HAZnIII da hidrólise **A**.

Tabela 22. Frequências vibracionais na região do infravermelho referentes a hidrólise A e ao composto HAZnIII, e suas respectivas atribuições.

Hidrólise A	HAZnIII	Atribuições
3360 F,I	3499 F,I	νOH
3202 F,I	3449 F,I	νNH
2950 om	2945 om	νCH
1721 m	1710 f	$\nu\text{C=O}$
1594 F,I	1604 F,I	$\delta \text{H}_2\text{O} + \delta_{\text{as}}\text{NH}_2 +$
1401 F,I	1384 F – 1374 F	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1320 om	1317 m	νCC
-	1238 f	Amida III
1140 m – 1115 m	1160 m – 1115 m	$\nu\text{C-O}$
1067 m – 1042 m	1068 m – 1037 m	$\nu\text{C-O} + \nu\text{CN} + \delta \text{C-H}$
974 mf	904 f	$\nu\text{CC} + \nu\text{CN}$
875 mf – 830 mf	864 f	$\delta \text{C-H}$

757 f	788 F – 766 m	ν_{CC}
728 f	720 m	ρ_{CH_2}
665 f	674 m – 667 m	ρ_{OH}
605 f – 583 f	520 f	δ_{COO^-}
490 f	446 m	waggingOH +
427 f	434 m	δ_{CCC}

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

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

A banda atribuída a ligação amida aparece no composto **HAZnIII** em 1238 cm^{-1} conhecida como amida III, que trata-se de vibrações do esqueleto proteico, (principalmente envolvendo ligações C-C e C-N).

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

III.3.5 – Paládio e Platina

O fato de não ter sido obtido nenhum produto com os metais paládio e platina e o hidrolisado A (soro de leite), deve-se à natureza *soft* desses metais e, a baixa quantidade de aminoácidos sulfurados nesse ligante natural. Portanto, para a formação de tais complexos, requerem-se ligantes naturais onde a presença de aminoácidos sulfurados (bases *softs*) seja significativa.

III.3.6 – Prata

A Figura 28 mostra os espectros vibracionais na região do IV da hidrólise B e do composto **HBAgl**, e a Tabela 23 mostra as principais frequências vibracionais do composto **HBAgl**.

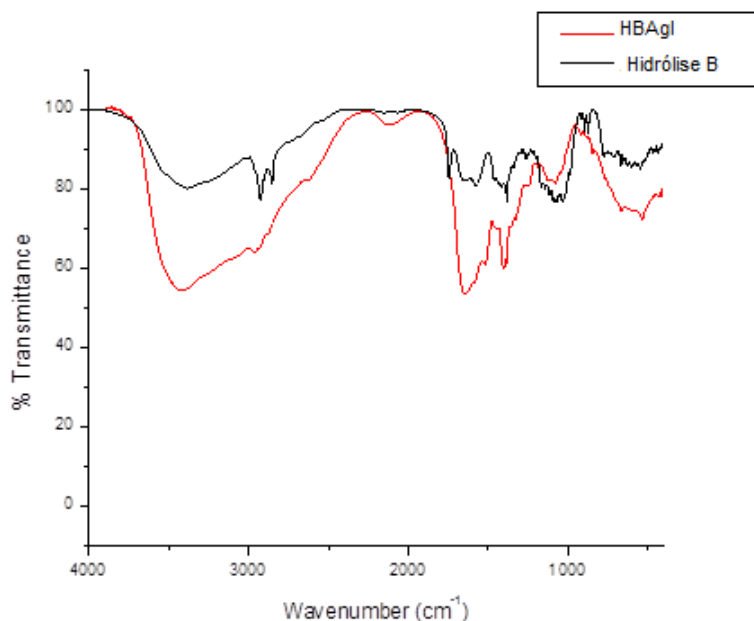


Figura 28. Espectros vibracionais na região do infravermelho da hidrólise B e do composto **HBAgl**.

Tabela 23. Principais frequências vibracionais na região do infravermelho do composto **HBAgl**.

HBAgl	Atribuições
3393 <i>m</i>	νOH
3245 <i>m</i>	νNH
2924 <i>m</i>	νCH
1640 <i>mF</i>	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1401 <i>m</i>	$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$
1329 <i>f</i>	νCC
1116 <i>m</i>	$\nu\text{C-O}$
705 <i>f</i>	ρCH_2
666 <i>f</i>	ρOH
602 <i>f</i>	δCOO^-

Neste caso, pode-se perceber a presença das bandas $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ (1640 cm^{-1}), $\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$ (1401 cm^{-1}) e $\nu\text{C-O}$ (1116 cm^{-1}) sugerindo a coordenação do íon prata aos aminoácidos do soro de leite. No entanto, dois dias após armazenamento do sólido liofilizado e na ausência de luz, houve decomposição do material.

III.4 - 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

HACuIII a porcentagem de Cu(II) é de 19,46%, para **HACuII** é de 34,35% e de **HACuI** 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%⁴⁵.

III.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia e tamanho de partícula dos compostos **HACuII** (Figura 29) e **HACuIII** (Figura 30) foram investigados via MEV.

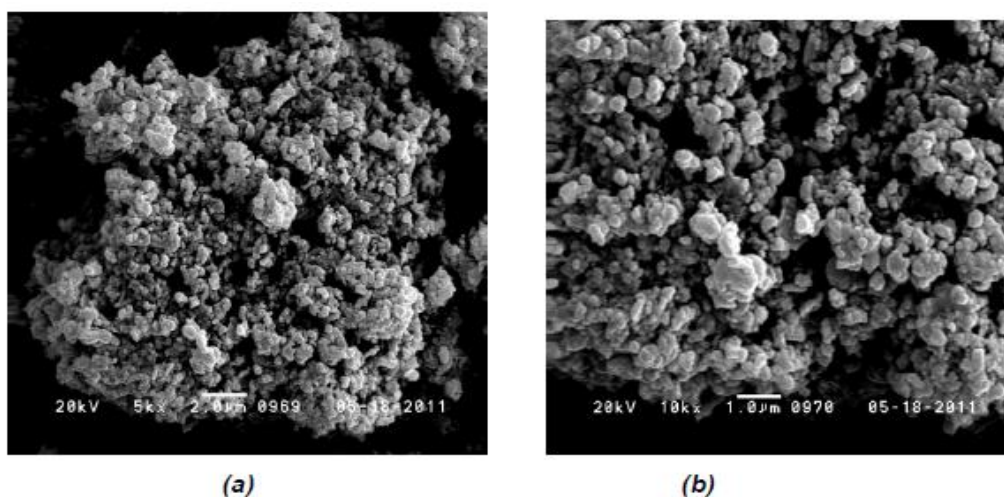


Figura 29. Imagens MEV de HACuII com ampliação de 5.000 vezes (a); 10.000 vezes (b).

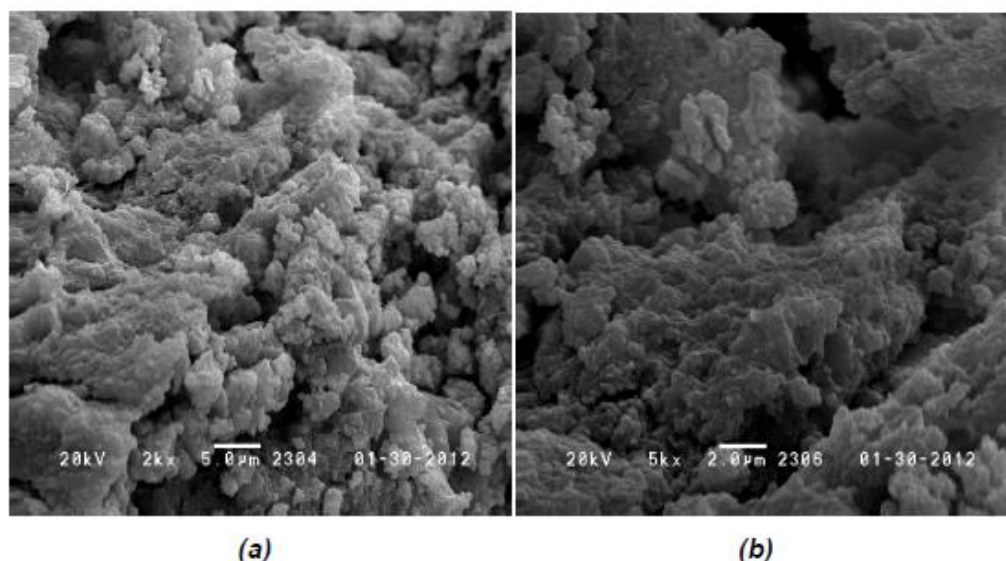


Figura 30. Imagens MEV de HACuIII com ampliação de 2.000 vezes (a); 5.000 vezes (b).

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) (**HACuI**), observa-se um aglomerado de partículas com tendência a esfericidade e diâmetro da ordem de 0,5 μm .

Já para o composto **HACuIII**, 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).

III.6 - Complexometria com EDTA, Análise Elementar e Intervalo de Decomposição

O hidrolisado do soro do leite e uma mistura de diversos aminoácidos e pequenos peptídeos com alta capacidade de coordenação ao centro metálico, e por essa razão, torna-se impossível identificar a presença de aminoácidos ou peptídeos específicos. Contudo, para descrever o hidrolisado e seus complexos aqui obtidos,

bem como estudar suas propriedades funcionais, não é necessário elucidar a composição exata dessas espécies. Por essa razão, os dados analíticos obtidos dos compostos **HACoI**, **HACoII**, **HACoIII**, **HAZnI**, **HAZnII** e **HAZnIII**, que estão apresentados na Tabela 24, devem ser analisados com o devido cuidado, imaginando tratar-se de uma “composição média” do material formado.

Tabela 24. Cores, dados analíticos e intervalos de decomposição das amostras sintetizadas.

Amostra	Cor	Análise Elementar				Dec.
		Co(II)%	Zn(II) %	C%	H%	N%
HACoI	Rosa Claro	25,57		13,46	3,15	194 – 198
HACoII	Marrom	25,22		17,44	3,38	182 – 188
HACoIII	Rosa	23,34		11,63	4,06	196 – 200
HAZnI	Amarelo		17,33	20,53	3,63	181 – 186
HAZnII	Amarelo		17,70	26,23	4,17	191 - 195
HAZnIII	Amarelo		19,85	19,37	4,01	183 - 189

III.7 - Determinação analítica do teor de cobre e ferro

Os resultados das análises de cobre e ferro para as amostras **HACuV**, **HACuVI**, **HACuIV**, **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII**, **HCCuIV**, **HAFel**, **HAFelII**, **HAFelIII**, **HBFeI**, **HBFeII** e **HBFeIII** estão compilados nas Tabelas 25 e 26, respectivamente.

Tabela 25. Resultados do teor de cobre nas amostras **HACuV**, **HACuVI**, **HACuIV**, **HCCuI**, **HCCuII**, **HCCuIII**, **HCCuIV**

Amostra	Cu ppm	% Cu
HACuV/HACuVI	550,35	55,03
HACuIV	500,15	50,02
HCCuI	156,49	15,65
HCCuII	121,35	12,14

HCCuIV	191,93	19,19
HCCuIII	112,17	11,22

Tabela 26. Resultados do teor de ferro nas amostras **HAFel**, **HAFell**, **HAFelll**, **HBFel**, **HBFeII** e **HBFeIII**

Amostras	Fe ppm	% Fe
HAFel	879,53	62,82
HAFell	833,32	59,52
HAFelll	833,32	59,52
HBFel	740,90	52,92
HBFeII	894,93	63,92
HBFeIII	756,30	54,02

III.8 - ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

III.8.1 - 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 na ausência ou presença de sais 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. A média dos resultados desse crescimento celular, para o isolado de *Xcc* FB04 com os respectivos desvios padrão está apresentada na Figura 31.

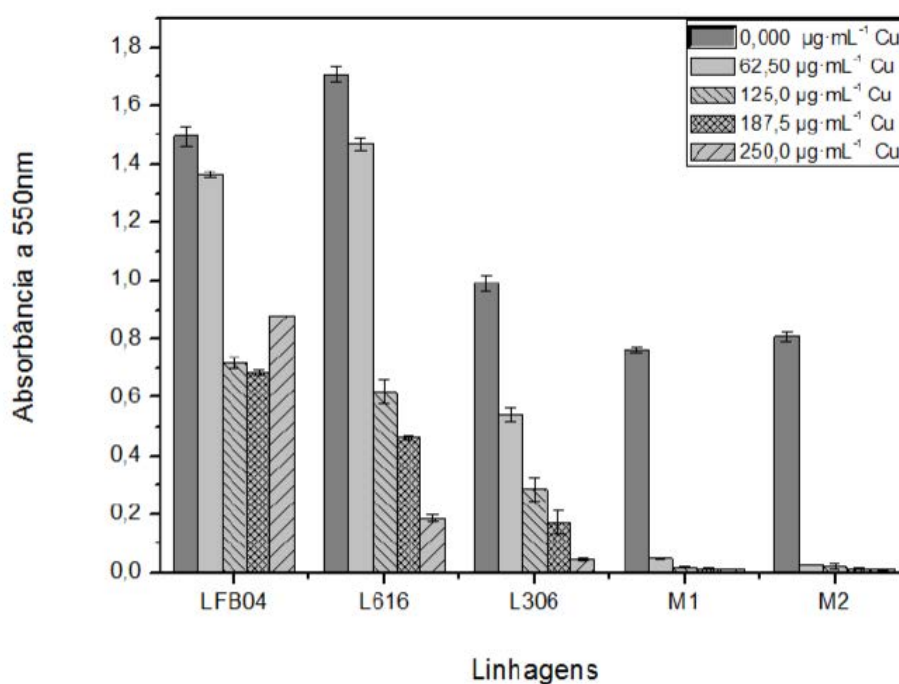


Figura 31. Crescimento celular para linhagens de Xcc, indicada na figura, em meio Nutriente tamponado, sem cobre e com $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 62,5; 125,0; 187,5 e 250,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A Figura 31 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.

Pode-se perceber que a linhagem LFB04 é a mais resistente das linhagens investigadas, sendo assim, utilizou-se esta linhagem para investigação dos compostos de cobre sintetizados, como pode-se visualizar na Figura 32.

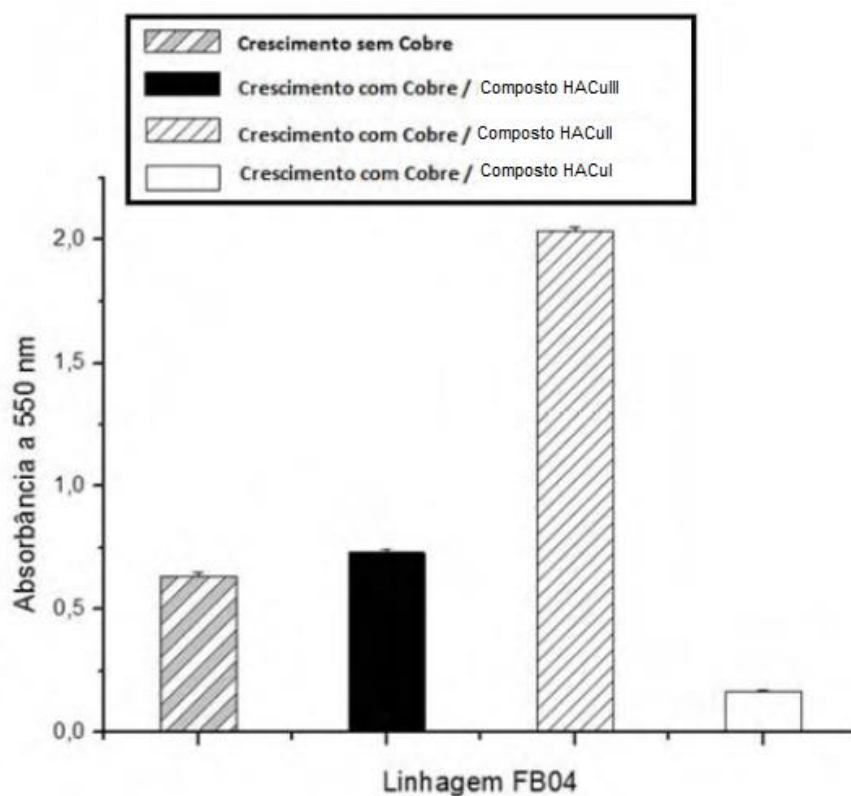


Figura 32. Crescimento celular para a linhagem FB04 de Xcc, em meio Nutriente Agar tamponado, sem cobre e com os compostos HACuIII, HACuI e HACu nas concentrações 410, 2820 e 906 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Observa-se então que, apesar da linhagem Xcc FB04 apresentar grande resistência ao cobre, o composto **HACuI** apresentou eficácia frente à essa linhagem, demonstrando assim ser um potencial composto para o combate ao cancro cítrico.

IV. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, a principal conclusão, do ponto de vista conceitual, foi a de que hidrolisados protéicos de origem natural se constituem, indubitavelmente, em ligantes alternativos para a complexação de íons metálicos, por apresentarem grupos funcionais potencialmente coordenantes. Além disso, foi demonstrado neste trabalho que dependendo do método de síntese ou das condições experimentais, principalmente pH e natureza do solvente, os hidrolisados protéicos podem interagir com os metais através de diferentes modos de coordenação, dando origem, portanto, a diferentes espécies metálicas. Foram escolhidos dois substratos, um de origem animal e outro de natureza vegetal, mas que contivessem praticamente o mesmo conteúdo protéico.

Além disso, a utilização racional dessas fontes protéicas de origem natural, que são subprodutos das fabricações de óleos e queijos, faz-se necessária uma vez que via de regra a eles são destinados fins não tão nobres, como aqueles que estão se propondo neste trabalho. Os complexos obtidos poderão ser utilizados para diversas finalidades como suplementação humana (Fe), animal (Co) e vegetal (Zn, Cu) ou como potencial metalofármacos antimicrobianos (Cu).

Conclui-se, então, que se pode aliar a utilização de materiais que seriam descartados, e acabariam se tornando contaminantes ambientais, à demanda de novos fármacos e suplementos, resultando em novos complexos metálicos, de fácil obtenção, e custo relativamente baixo.

V. CONTEXTUALIZAÇÃO

O envolvimento em um trabalho de natureza científica influencia consideravelmente no crescimento pessoal e profissional, tendo em vista que demanda responsabilidade, compromisso, dedicação e aprendizagem ao lidar com companheiros de trabalho e orientadores, assim como os principais trabalhos refletindo o estado-da-arte nesse campo.

O tema apresentado aqui é pouco explorado dentro da graduação, se limitando a apenas uma única disciplina do curso; sendo assim, todo o aprendizado adquirido neste trabalho foi de extrema importância para o entendimento de que um fármaco para apresentar atuação farmacológica não necessariamente precisa ser de natureza puramente orgânica. De fato, a área que Química Inorgânica Medicinal tem crescido muito nos últimos anos e despertado o interesse de pesquisadores importantes que trabalham na área.

Além disso, as técnicas utilizadas também foram novidade por nem todas serem abordadas dentro da graduação, e que podem auxiliar no mercado de trabalho, futuramente.

Pode-se concluir, então, que o Trabalho de Conclusão de Curso surge aqui como um importante e necessário complemento da graduação, por permitir explorar diversos temas, técnicas e responsabilidades, demonstrando a importância de sua realização.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo, 2002
2. TORRES, D. P. M. **Geleificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino**: comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos-polissacarídeos. 2005. 118f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos). Universidade do Minho, Braga, 2005
3. HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technol.**, Chicago, v. 50, p. 49-52, 1996
4. 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
5. 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
6. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein quality evaluation: report of the joint FAO/WHO expert consultation**. Rome, 1991. 66 p
7. BIASUTTI, E. A. R., AFONSO, W. O., LOPES JUNIOR, C. O., COELHO, J. V., SILVA, V. D. M., SILVESTRE, M. P. C. Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 44, n.1. 2008
8. LIMA, C. C. Aplicação das Farinhas de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) no Processamento de Pães com Propriedades Funcionais. Universidade Federal do Ceará, 2007
9. RABETAFIKA, H. N.; REMOORTEL, V. V.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C. Flaxseed proteins: food uses and health benefits 221, 222, 225,226, 2010
10. OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Flaxseed proteins--a review. 109,110, 1993
11. PANIZ, C. et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnostico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 323-334, 2005
12. ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 60, p. 729-738.
13. LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. Sao Paulo: EdgardBlucher, 1999. 527 p
14. UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3rd. ed. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 614 p

15. McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. 6th. ed. Edinburgh: Pearson Education, 2002. 693 p.
16. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Principais deficiências minerais em bovinos de corte**. Campo Grande, 2001. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/325198>>. Acesso em: 11 out. 2015
17. COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Advanced inorganic chemistry**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 1455 p
18. HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorcao e biodisponibilidade do zinco e suas correlacoes com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.
19. PEREIRA, T. C.; HESSEL, G. Deficiencia de zinco em crianças e adolescentes com doencas hepaticas cronicas. **Revista Paulista Pediatria**, v. 27, n. 3, p. 322-328, 2009
20. ASHMEAD, H. D.; SAMFORD, R. A. Effects of metal amino acid chelates or inorganic minerals on three successive lactations in dairy cows. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 2, n. 3, p. 181-188, 2004.
21. 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.
22. BARAN, E. J. Trace elements supplementation: recent advances and perspectives. **Mini-Rev. in Med. Chem.**, v. 4, p.1-9, 2004
23. OLIVEIRA, R. P.; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2008.
24. BARAN, E. J. Suplementação de elementos-traços. CADERNOS TEMÁTICOS DE QUÍMICA NOVA NA ESCOLA, Nº 6, 2005.
25. FISBERG, M.; BRAGA, J. A. P.; BARBOSA, T. N. N.; MARTINS, F. O. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ferro, Série de publicações ILSI, 2008.
26. INCA. **Câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oque>. Acesso em 18 out 2015.
27. ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p. 481-489, 2003.
28. WENZEL, M. et al. Multinuclear cytotoxic metallodrugs: physicochemical characterization and biological properties of novel heteronuclear gold–titanium complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 50, n. 19, p. 9472-9480, 2011.

29. KLUEH, U. et al. Efficacy of Silver-Coated Fabric to Prevent Bacterial Colonization and Subsequent Device-Based Biofilm Formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, V. 53, p. 621-631, 2000.
30. CARVALHO, M. A., de PAIVA, R. E. F., BERGAMINI, F. R. G., GOMES, A. F., GOZZO, F.C., LUSTRI, W. R., FORMIGA, A. L. B., SHISHIDO, S. M., FERREIRA, C. V., CORBI, P. P. A silver complex with tryptophan: Synthesis, structural characterization, DFT studies and antibacterial and antitumor assays *in vitro*. **J. Mol. Struc.**, v. 1031. p. 125-131. 2013.
31. MARQUES, D. P. et al. Separação das proteínas do soro do leite por DEAETRISACRYL. **Rev. Alim. Nutr.**, v. 16, n. 1, p. 17-20, jan./ mar. 2005.
32. 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.
33. 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.
34. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
35. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Leite e derivados**. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/>>. Acesso em: 3 jul. 2012.
36. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
37. Silva, F. G. D. et al. Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of *In vitro* Digestion. **Plant Foods Hum Nutr**, p. 24-30. 2013).
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. KRASNOVA, I. N.; KARTSNOVA, L. A.; CHERKAS, Y. V. Determination of amino acids in human blood serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the isocratic elution mode. **Journal of Analytical chemistry**, v. 55, p. 58-65, 2000.

42. PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Rev. Alim. Nutr.** v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.
43. ANDREAS, B. The infrared absorption of amino acid side chains. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 74, p. 141-173, 2000
44. STUART, B. **Infrared spectroscopy**: fundamentals and applications. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 142.
45. 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.

Dados finais

Araraquara, 11 de Janeiro de 2016

Aline Renata Pavan

Prof. Dr^a. Regina Célia Galvão Frem