Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Departamento de Ciências Farmacêuticas

Preparação e caracterização físico-química de complexos de hidrolisados parciais de proteína com minerais

Renata Franzan

Ribeirão Preto
2006

RENATA FRANZAN

Preparação e caracterização físico-química de complexos de hidrolisados parciais de proteína com minerais

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Franzan, Renata
Preparação e Caracterização Físico-Química de Complexos de Hidrolisados Parciais de Proteína com Minerais. Ribeirão Preto, 2006.

100 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Minerais essenciais. 2. Quelatos. 3. Biodsponibilidade. 4. Cobre. 5. Ferro. 6. Manganês. 7. Zinco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Franzan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura

Aos meus queridos Ivonete, Antonio, Ricardo e Sérgio, com muito amor e plena gratidão pela compreensão, carinho, paciência, lealdade e apoio incondicional durante todo caminho percorrido ao longo da elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelos momentos de luz que sempre me guiaram ao alcance dos meus objetivos.

Aos meus pais, Ivonete e Antonio, por acreditar e confiar sempre, pelo patrocínio dos meus sonhos, pelos ensinamentos ao longo de toda a vida, pela presença em todos os momentos que eu precisei e pelo amor incondicional e eterno que sempre teremos uns pelos outros.

Ao meu irmão Ricardo, pelo carinho e estímulo de viver a vida intensamente.

Ao meu companheiro Sérgio, por estar junto a mim em todos os momentos, bons ou ruins, sentindo sua presença e seu amor mesmo à distância. Pelo apoio, amor, carinho e principalmente pela compreensão. Por me fazer enxergar sempre o que há de bom ao meu redor com entusiasmo e alegria. Por me fazer feliz todos dias e ter dado à minha vida o amor, essencial, e o colorido que faltava para ela se tornar completa e plena.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, por ter me ensinado que quando queremos muito alcançar um objetivo já percorremos metade de sua trajetória, por ter me dado a oportunidade e confiado em desenvolver esse trabalho, pelos ensinamentos e pela contribuição para o meu crescimento profissional, científico e intelectual.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal, pelos ensinamentos valiosíssimos para o desenvolvimento deste trabalho, pelos conselhos e pelo suporte dado para que o trabalho se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Alberto Federman Neto pelo auxílio na interpretação dos espectros de absorção na região do infra-vermelho.

Aos meus colegas da UEL, em especial Thalita e Marli, que foram mais do que colegas, foram e são verdadeiras amigas, pelo apoio incondicional.

Aos meus professores da UEL, que me incentivaram a dar esse passo e colocaram-se à disposição para me ajudar, serei eternamente grata.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento Farmacotécnico, Alessandra, Camila Areda, Camila Rediguieri e Priscila, pela paciência, pelo apoio em todos os momentos, por me ensinarem e continuarem me ensinando, pelas risadas e por fazerem do ambiente de trabalho um lugar prazeroso. Nunca me esquecerei de vocês!!!

Ao Zé Maria, pela amizade, pelo apoio e principalmente pela alegria.

Ao pessoal do Laboratório de Química de Proteínas, em especial à Clarice e a Helen, pela ajuda na parte da caracterização dos hidrolisados e pelos ensinamentos úteis para o desenvolvimento desta etapa do trabalho.

À Maria Perpétua e ao Laboratório Fermavi pelo auxílio na caracterização dos complexos peptídeo-mineral.

Ainda agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a construção deste trabalho.

A todos meus sinceros e eternos agradecimentos.

“O dia mais belo? Hoje

“A coisa mais fácil? Errar

O maior obstáculo? O medo

...

O melhor remédio? O otimismo

A maior satisfação? O dever cumprido

A força mais potente do mundo? A fé

As pessoas mais necessárias? Os pais

As mais belas das coisas? O amor”

MADRE TEREZA DE CALCUTÁ

RESUMO

Os minerais essenciais participam de várias funções vitais do organismo, suas deficiências contribuem de maneira significante para a morbidade e mortalidade na infância, especialmente nos países em desenvolvimento, sendo consideradas como problema de saúde pública em todo o mundo. Minerais apresentados na forma de complexos orgânicos têm sido propostos para correção destas deficiências por apresentarem maior biodisponibilidade, quando comparados aos equivalentes sais inorgânicos. Os minerais cobre, ferro, manganês e zinco são essenciais aos organismos vivos (humano e animal), a manutenção de seus níveis de acordo com as necessidade fisiológicas contribuem para a manutenção da saúde, resultando em benefícios econômicos. No presente trabalho foi realizada a preparação e caracterização físico-química de complexos dos minerais Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn) com hidrolisados parciais de proteína de soja. As hidrólises utilizando as enzimas Aranzime e Alcalase foram mais eficientes que as demais hidrólises enzimáticas ou ácidas, entretanto somente a Alcalase foi aprovada para a manufatura de produtos alimentares de consumo humano. A coordenação entre os metais e o hidrolisado pode ser confirmada por pelo deslocamento das bandas ν_{NH2}, ν_{aCOO^-} e ν_{sCOO^-}. Os complexos obtidos de cobre, ferro, manganês e zinco, posuem em sua composição os respectivos percentuais de ligação: 2,21%, 1,22%, 12,38% e 10,40%.

ABSTRACT

The essential minerals participate in many vital functions in the organism, its deficiencies contribute in significant way for the morbidity and mortality in the childhood, especially in developing countries, being considered as public health problem in the whole world. Minerals presented in the form of organics complexes have been considered a good choice for these deficiencies, because it presents greater bioavailability when compared with the equivalents inorganic salts. The minerals copper, iron, manganese and zinc are essential to the organisms (human and animal), its physiological levels in accordance with the necessity contribute for the health maintence, resulting in economical benefits. In the present work it was carried through preparation and physical and chemical characterization of mineral complexes of Copper (Cu), Iron (Fe), Manganese (Mn) and Zinc (Zn) with partial hydrolysates of soy protein. The hydrolyses using the Aranzime and Alcalase enzymes had been more efficient than other enzymatic or acid hydrolyses, however only the Alcalase enzyme is approved for the manufacture of alimentary products for human consumption. Coordination between metals and the hydrolysate can be confirmed by the displacement of the ν_{NH2}, ν_{aCOO}- and ν_{sCOO}- bands. The gotten copper, iron, manganese and zinc complexes, had the respective percentages of metal in its composition: 2,21%, 1,22%, 12,38% e 10,40%.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Perfil de eluição dos padrões utilizados na calibração da coluna Superdex Peptide HR 10/30 (fase estacionária), Acetonitrila + TFA 0,1% (fase móvel), detecção em UV a 214 nm num fluxo de 0,5mL/min.....**35**

FIGURA 2 – Perfis de eluição da proteína intacta, diluída nos diferentes solventes (H_2O + NH_4OH, H_2SO_4 e HCl) utilizados no processo de hidrólise.....**36**

FIGURA 3 – Perfil de eluição dos Hidrolisados protéicos obtidos com HCl 3,0M...**37**

FIGURA 4 – Comparação entre o perfil de eluição dos padrões e dos Hidrolisados obtidos com HCl 3,0M nos tempos: 3, 6 e 9 horas.....**38**

FIGURA 5 – Comparação do perfil cromatográfico da proteína intacta com os Hidrolisados obtidos com HCl 3,0M.....**39**

FIGURA 6 – Perfil de eluição dos Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.....**40**

FIGURA 7 – Comparação do perfil cromatográfico da proteína intacta com os Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.....**41**

FIGURA 8 – Comparação entre o perfil de eluição dos padrões e dos Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.....**42**

FIGURA 9 – Comparação dos Perfis de dos Hidrolisados obtidos com HCl e H_2SO_4 3,0M.....**43**

FIGURA 10 – Perfil de Hidrólise enzimática da Proteína de Soja com Aranzime.....**44**

FIGURA 11 – Perfil de eluição da proteína intacta e os respectivos Hidrolisados obtidos com Aranzime (1,8%, 3,6% e 5,4)%.....**45**

FIGURA 12 – Comparação do Perfil de Hidrólise de Proteína de Soja utilizando Enzima Neutrase com os perfis dos padrões e da Proteína de Soja intacta.....**46**

FIGURA 13 – Comparação do Perfil de Hidrólise de Proteína de Soja utilizando Enzima Alcalase com os perfis dos padrões e da Proteína de Soja intacta.....**46**

FIGURA 14 - Voltamograma do Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja.....**51**

FIGURA 15 - Voltamograma da Solução de Cloreto de Manganês em KCl 0,1M.....**52**

FIGURA 16 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 2:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**53**

FIGURA 17 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 2,66:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**54**

FIGURA 18 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**55**

FIGURA 19 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3,33:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**56**

FIGURA 20 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3,64:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**56**

FIGURA 21 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 4:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.....**57**

FIGURA 22 - Voltamograma da Solução de Cloreto de Zinco em KCl 0,1M.....**58**

FIGURA 23 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 2:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M.....**59**

FIGURA 24 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 2,66:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M.....**60**

FIGURA 25 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 3,33:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M.....**61**

FIGURA 26 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 3,64:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M.....**61**

FIGURA 27 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 4:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M.....**62**

FIGURA 28 – Comparação dos espectros na região do infravermelho do Hidrolisado e dos complexos obtidos a partir de Cu, Fe, Mn e Zn.....**70**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Rendimento do processo de hidrólise com H_2SO_4 e com HCl, (massa retida no filtro/massa de proteína x 100).....**32**

TABELA 2 - Rendimento do processo de hidrólise Enzimática com Arazima Bruta, (massa retida no filtro/massa de proteína x 100).....**33**

TABELA 3 – Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide HR 10/30.....**35**

TABELA 4 – Quantidade estimada de metal a ser complexado com o Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%.....**47**

TABELA 5 – Variação do pH durante a reação de complexação.....**48**

TABELA 6 – Rendimento da reação de complexação.....**49**

TABELA 7 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $MnCl_2$ 0,5M para o ensaio de voltametria cíclica.....**50**

TABELA 8 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $ZnCl_2$ 0,5M para o ensaio de voltametria cíclica.....**51**

TABELA 9 – Relação entre os volumes de Hidrolisado obtido por Hidrólise Enzimática com Aranzime e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.....**63**

TABELA 10 – Relação entre os volumes de Hidrolisado por Hidrólise Enzimática com Neutrase e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.....**64**

TABELA 11 – Relação entre os volumes de Hidrolisado obtido por Hidrólise Enzimática com Alcalase e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.....**65**

TABELA 12 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $CuCl_2$ 0,5M para a reação de complexação e posterior passagem pela coluna de resina catiônica.....**66**

TABELA 13 – Quantificação de metal ligado aos complexos de Cu, Fe, Mn e Zn com Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtido com Aranzime.....**67**

TABELA 14 – Quantificação de metal Ferro (Fe) ligado aos complexos dos Hidrolisados Parciais de Proteína de Soja obtidos com as enzimas Neutrase e Alcalase.....**67**

TABELA 15 – Porcentagem de metal ligado aos produtos comercializados pela ALBION LABORATORIES INC.....**68**

TABELA 16 – Análise dos espectros de infravermelho do Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja e dos Complexos formados a partir de Cu, Fe, Mn e Zn.....**69**

LISTA DE SIGLAS

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

LH – Hormônio Lutenizante

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

HDL_2 – Lipoproteína de Alta Densidade

IPS – Isolado Protéico de Soja

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

TFA – Ácido Trifluor Acético

FTIR – Infra-vermelho com Tranformada de Fourier

AAFCO - Association of American Feed Control Officials

FPLC - Fast Performance Liquid Chromatography

LISTA DE SÍMBOLOS

Co – Cobalto
Cu – Cobre
Cr – Crômio
Fe – Ferro
I – Iodo
Mn – Manganês
Se – Selênio
Zn – Zinco
Ca – Cálcio
Da - Dáltons
Fe-Ca-Fitato – Complexo insolúvel formado pelos metais Fe e Ca com fitato
Fe^{3+} - Íon Férrico
$^{\bullet}OH^{-}$ - Radical Hidroxil
[O] – Oxigênio Nascente
MnO_2 – Prolusita
$MnSiO_3$ – Rodocrosita
$3Mn_2O_3.MnSiO_3$ – Braunita
HCl – Ácido Clorídrico
H_2SO_4 – Ácido Sulfúrico
NH_4OH – Hidróxido de Amônio
$MnCl_2$ – Cloreto de Manganês
$ZnCl_2$ – Cloreto de Zinco
$FeCl_3$ – Cloreto Férrico
$CuCl_2$ – Cloreto de Cobre
Pt – Platina
Ag/AgCl – Prata/Cloreto de Prata
$-NH_2$ – Grupamento amina
$-COO^{-}$ - Grupamento carboxílico
ν_{NH2} – Estiramento do grupamento amino
ν_{aCOO^-} - Estiramento assimétrico do grupamento carboxílico
ν_{sCOO^-} - estiramento simétrico do grupamento carboxílico
N-H – Representa a ligação entre os átomos de nitrogênio e hidrogênio
O-H - Representa a ligação entre os átomos de oxigênio e hidrogênio
N-Metal – Representa a ligação entre os átomos de nitrogênio e metal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01

1.1 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO OU QUELATOS..... 04

1.1.1 Definição..... 04

1.1.2 Reação de Quelação..... 05

1.1.3 Particularidades dos Quelatos..... 05

1.1.4 Estrutura dos Quelatos..... 06

1.2 BIODISPONIBILIDADE DOS MINERAIS..... 06

1.3 COBRE..... 08

1.3.1 Importância biológica do cobre..... 08

1.3.2 Deficiência de cobre..... 09

1.3.3 O cobre na forma de composto de coordenação..... 10

1.4 FERRO..... 11

1.4.1 Importância biológica do ferro..... 11

1.4.2 Deficiência de ferro..... 12

1.4.3 O Ferro na forma de composto de coordenação..... 15

1.5 MANGANÊS..... 16

1.5.1 Importância biológica do manganês..... 16

1.5.2 Deficiência de manganês..... 16

1.5.3 O Manganês na forma de composto de coordenação..... 17

1.6 ZINCO..... 18

1.6.1 Importância biológica do zinco..... 18

1.6.2 Deficiência do zinco..... 19

1.6.3 O Zinco na forma de composto de coordenação..... 20

2. OBJETIVOS..... 22

2.1 OBJETIVO GERAL..... 23

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 23

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 24

3.1 MATERIAIS..... 25
3.2 MÉTODOS..... 25
3.2.1 Preparação dos hidrolisados ácidos parciais de isolado protéico de soja (IPS)..... 25
3.2.2 Preparação do hidrolisados enzimáticos parciais de IPS..... 26
3.2.2.1 Aranzime..... 26
3.2.2.2 Neutrase..... 26
3.2.2.3 Alcalase..... 27
3.2.3. Avaliação do rendimento do processo..... 27
3.2.4. Caracterização dos hidrolisados..... 28
3.2.4.1.Estimativa da distribuição de tamanho dos peptídeos..... 28
3.2.5 Método de Preparação do complexo Peptídeo-Mineral..... 28
3.2.6 Caracterização físico-química do complexo peptídeo-mineral..... 29
3.2.6.1. Quantificação do metal ligado aos peptídeos..... 29
3.2.6.2 Avaliação do sítio de ligação..... 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 30
4.1. PREPARAÇÃO DO HIDROLISADO PARCIAL DA PROTEÍNA DE SOJA..... 31
4.2 Caracterização do Hidrolisado Parcial da Proteína de Soja..... 34
4.3 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO PEPTÍDEO-MINERAL..... 47
4.3.1 Reação de complexação da solução do Hidrolisado de proteína de soja 10% com os metais Cu, Fe, Mn e Zn..... 47
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO PEPTÍDEO-MINERAL..... 67
4.4.1. Quantificação do metal ligado aos Peptídeos..... 67
4.4.2 Avaliação do sítio de ligação..... 68
5. CONCLUSÃO..... 72
REFERÊNCIAS..... 74

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A alimentação e a nutrição constituem requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando o crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania (Política Nacional de Alimentação e Nutrição, 2003).

Vários nutrientes inorgânicos são essenciais à vida, estão distribuídos amplamente na natureza, e atuam no organismo participando de várias funções bioquímico-metabólicas vitais, tais como: os sistemas enzimáticos, envolvidos no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos; na regulação hídrica e balaço eletrolítico; na consolidação óssea, na atividade neural e muscular (BRODY, 1994). De maneira geral, estes nutrientes estão presentes no organismo em pequenas quantidades, e devem ser fornecidos pela dieta, sendo os principais o Cobalto (Co), Cobre (Cu), Crômio (Cr), Ferro (Fe), Iodo (I), Manganês (Mn), Selênio (Se) e Zinco (Zn) (GOLDHABER, 2002; HOSTETLER et al., 2003; LOBO, 2004).

Estes minerais são encontrados nos alimentos, porém em quantidades e disponibilidade variadas, portanto a dieta diária deve ser balanceada. Pessoas que fazem uso de dietas hipocalóricas apresentam alta probabilidade de desenvolverem deficiência de minerais. Outros fatores podem desencadear deficiências minerais, como: uso de medicamentos que interferem com a absorção ou metabolismo de um mineral; consumo de álcool; doença renal; doenças gastrintestinais, hemorragia e diarréia. Os minerais essenciais são classificados em dois grandes grupos: macrominerais, aqueles cujas necessidades diárias variam de cem miligramas a gramas, como por exemplo: fósforo, cálcio,

magnésio, sódio, potássio, cloreto; e microminerais, aqueles cujas necessidades diárias são menores que cem miligramas, como por exemplo ferro, zinco, iodeto, cobre, manganês, fluoreto, crômio, selênio, molibdênio e cobalto (ALBION LABORATORIES INC – Mineral – vital components of your dietery intake,1993; MERCK, 2006; MÜLLER, 2005).

As deficiências de minerais essenciais contribuem de maneira significativa para a morbidade e mortalidade na infância, especialmente nos países em desenvolvimento (MISHAAN et al, 2003), sendo consideradas como problema de saúde pública em todo o mundo (WATZKE, 1998). Muitas doenças metabólicas e fisiopatológicas são decorrentes de ingesta ou absorção inadequada destes nutrientes (HOUSE, 1999).

Deficiências de minerais podem ocorrer como deficiência primária quando a ingestão do mineral é inadequada ou como deficiência secundária quando outros fatores da dieta interferem na absorção ou no metabolismo (OSLON et al, 1999).

A má nutrição está cada vez mais sendo reconhecida como um problema de saúde importante e prevalente, em muitos países. Problema com sérias conseqüências em longo prazo para crianças podendo influenciar seu desenvolvimento. Mais de 2 bilhões de pessoas vivem em situação de risco de doenças relacionadas a deficiências de minerais, sendo as deficiências mais comuns aquelas relacionadas ao ferro e iodeto, sendo maior a incidência em mulheres na idade fértil e crianças dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (LATHAM et al, 2001).

Como estratégias de combate a algumas deficiências nutricionais tem sido instituído em vários países programas de suplementação mineral

utilizando-se a fortificação alimentos ou a suplementação medicamentosa, os quais em sua maioria, utilizam sais inorgânicos. Porém, minerais apresentados na forma de complexos ou quelatos orgânicos têm sido propostos, por apresentarem maior biodisponibilidade (ATTAELMANNAN et al., 1996; LOBO, 2004; ASHMEAD, 2004). O complexo metálico, ou quelato, de maneira geral é estável às condições do trato gastrintestinal, evitando a formação de complexos insolúveis e, portanto, não biodisponíveis (SPEARS, 1996; PEIXOTO, 2005).

MARCHETTI (2000) demonstrou a viabilidade de fortificação de alimentos com vitaminas e minerais quelados a aminoácidos. Nestas condições, a presença dos minerais não aumentou a velocidade de degradação das vitaminas. Esta estabilidade foi atribuída a menor ionização dos minerais, possibilitando, portanto a administração conjunta.

1.1 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO OU QUELATOS

1.1.1 Definição

A “Association of American Feed Control Officials” – AAFCO (2000) classifica e define estes compostos como: Quelato metal-aminoácido é um produto resultante da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos na proporção molar, isto é, um mol do metal para três mols (preferencialmente dois) de aminoácidos na forma de ligação covalente coordenada; Complexo aminoácido-metal é um produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácido (s); e Metal proteinado é o produto resultante da quelação de um sal solúvel com uma proteína parcialmente hidrolisada (BARUSELLI, 2005).

Os quelatos são compostos de coordenação, onde o metal é o ligante receptor de elétrons, em contraste, nos sais inorgânicos, o cátion é ligado

através de interações eletrostáticas (TAPIERO, 2001). Uma vez quelado o mineral, os produtos que o compõem, já não são aminoácidos ou íons de metal, eles compartilham propriedades com os metais e aminoácidos, conservando, porém, propriedades exclusivas. Um mineral que foi corretamente quelado tende a ser absorvido no intestino de forma semelhante a um dipeptídeo ou tripeptídeo, que normalmente apresentam altos coeficientes de absorção (BARUSELLI, 2005).

1.1.2 Reação de Quelação

Na reação de quelação, o ligante deve conter: 1) grupos funcionais capazes de estabelecer ligações covalentes e coordenativas; 2) o quelato deve ser estericamente possível; 3) a reação de quelação deve ser energeticamente possível. Entretanto para que o quelato de metal apresente propriedades nutricionais, ele deve possuir as seguintes características: 1) deve possuir baixo peso molecular; 2) sua constante de estabilidade deve ser nutricionalmente funcional; e 3) o ligante deve ser metabolizado pelo organismo (ASHMEAD, 2001).

1.1.3 Particularidades dos Quelatos

Os quelatos de minerais devem estar fundamentados em algumas características:

I) Tamanho: O tamanho do quelato é pequeno o bastante para que os minerais com as suas moléculas carregadoras possam ser absorvidas sem sofrerem qualquer digestão.

II) Estabilidade: São compostos minerais estáveis menos vulneráveis às interações minerais adversas que ocorrem no aparelho digestivo. A

elevada estabilidade de um quelato adquirida por meio de eficientes processos de obtenção, assegura que o quelato não se rompa no estômago.

III) Neutralidade: O composto final não possui carga elétrica, com isto, o quelato pode ser absorvido no trato digestivo na forma original, além de não sofrer possíveis interferências dos demais componentes da dieta, que o tornaria solúvel (BARUSELLI, 2005).

1.1.4 Estrutura dos Quelatos

Os quelatos formam um anel estrutural em volta do íon metálico através das ligações coordenativas com o nitrogênio (amino) e oxigênio (carboxil) dos grupos doadores dos aminoácidos e/ou proteinatos. Sendo assim, podemos dizer que todos os quelatos são complexos, porém nem todos os complexos são quelatos (MILES,2000).

1.2 BIODISPONIBILIDADE DOS MINERAIS

Biodisponibilidade refere-se à proporção da quantidade total de elementos minerais presentes em um meio nutritivo que é potencialmente absorvível numa forma metabolicamente ativa (HOUSE; WELCH, 1984; WAPNIR, 1998; ANDRADE, 2003; MILES, 2000).

A quantidade total de um nutriente (por exemplo, mineral) em um alimento não reflete a quantidade que está disponível para absorção. O termo disponível refere-se à fração do nutriente que está presente na luz intestinal na forma solúvel. A biodisponibilidade representa o quanto do nutriente foi absorvido

e está disponível na corrente circulatória. Este termo foi introduzido para melhor distinguir disponibilidade química e a disponibilidade em bioensaios. A biodisponibilidade de um nutriente pode ser subdividida em três fases constitutivas: 1) disponibilidade do nutriente no lúmen intestinal; 2) absorção e/ou retenção no organismo; 3) utilização pelo organismo (WATZKE, 1998).

Sabe-se que um dos fatores que mais influenciam na absorção dos minerais é a sua forma química, sabe-se também que os microelementos fornecidos sob a forma inorgânica podem ter sua biodisponibilidade influenciada por fatores como outros nutrientes na dieta. No quelato o metal está quimicamente inerte, não sofrendo influências de outros componentes da dieta, como fibras e gorduras (BORGES, 2006).

Segundo Malleto (1984, APUD in BORGES, 2006 p.24) existem numerosas substâncias capazes de exercer ação quelante, dentre as quais podemos citar ácidos inorgânicos, ácidos orgânicos bicarboxílicos, diaminas, aminoácidos e peptídeos. Do ponto de vista nutricional, apenas quelatos formados com aminoácidos ou dipeptídeos são interessantes, pois apenas quelatos com peso molecular total abaixo de 1.500Da são capazes de penetrar a membrana intestinal sem exigir hidrólise adicional no lume (BORGES, 2006).

O ácido fítico presente em alguns alimentos é reconhecido como um composto que reduz a biodisponibilidade de minerais, entre outros, do ferro e zinco. Esta redução é devida à capacidade do ácido fítico de formar quelatos insolúveis com metais, especialmente os bivalentes e de transição, os quais precipitam na luz intestinal (HOUSE 1999).

1.3 COBRE

1.3.1 Importância biológica do cobre

O cobre é um microelemento essencial a todos os organismos vivos (CAMAKARIS et al, 1999; OLIVARES, 1996; MERCK, 2006), participando como co-fator de muitas enzimas, sendo a maioria oxidases (HASSAN et al, 2000), e as cuproenzimas localizadas no núcleo celular (CAMAKARIS, et al, 1999). Além disso, age nos sistemas fisiológicos e bioquímicos dos animais (LEÓN et al, 2000). Mais de 80% do cobre presente no plasma está ligado a ceruloplasmina, o restante está ligado à albumina (HASSAN et al, 2000).

As funções vitais do cobre são devidas a sua capacidade de doar ou receber elétrons, participando das reações de oxi-redução, entre outras, aquelas catalisadas pelas enzimas, superóxido dismutase e citocromo oxidase (HASSAN et al, 2000).

Entretanto, pela mesma via (reação de oxi-redução) o cobre pode gerar espécies de oxigênio altamente reativas (radicais superóxido e o hidroxil), os quais se não forem detoxificados eficientemente podem causar danos celulares irreversíveis (CAMAKARIS et al, 1999).

O cobre é necessário para o desenvolvimento e crescimento infantil, mecanismos de defesa, crescimento ósseo, maturação das células sangüíneas (eritrócitos e leucócitos), transporte de ferro e colesterol, metabolismo energético, contratilidade do miocárdio e desenvolvimento cerebral (OLIVARES, 1996).

1.3.2 Deficiência de cobre

A deficiência causada pelo cobre pode ser adquirida ou herdada (LINDER et al, 1998). A deficiência pode causar doenças neurodegenerativas (Alzheimer) e/ou sintomas neurológicos, doença de Menkes e doença de Wilson, sendo que as proteínas de Menkes e Wilson têm sido caracterizadas como transportadoras de cobre (STRAUSAK et al, 2001; MERCK, 2006).

O status nutricional do cobre e a integridade da mucosa são fatores determinantes para a absorção do cobre (WAPNIR, 1998). Este e o zinco são absorvidos preferencialmente na porção proximal do intestino delgado. O zinco interfere diretamente com a absorção intestinal de cobre, pela indução da síntese intestinal de metalotionina, para a qual o zinco tem maior afinidade. No entanto, a metalotionina-cobre é mais resistente à proteólise do que a metalotionina-zinco (HASSAN et al, 2000).

A deficiência de cobre, como deficiência adquirida é uma patologia encontrada principalmente em bebês, entretanto tem sido diagnosticado também em crianças e adultos. A maioria dos casos de deficiência de cobre têm sido descritos em crianças desnutridas. As manifestações clínicas mais freqüentes da deficiência de cobre são anemia, neutropenia e anormalidades ósseas. Outras manifestações menos freqüentes são: hipopigmentação dos cabelos, hipotonia prejuízo do crescimento, aumento da incidência de infecções, anormalidades do colesterol e metabolismo da glicose, e alterações cardiovasculares (OLIVARES, 1996).

O cobre é essencial na manutenção da homeostase do ferro, uma vez que, a hepahestina e ceruloplasmina são oxidases cobre dependente que

auxiliam a ferroportina-1 na transferência do ferro da membrana basolateral do enterócito para a transferrina na corrente circulatória (HARRIS, 1998; KUO, 2004). Esta participação foi demonstrada em animais com anemia geneticamente ligada ao sexo (defeito funcional congênito na hepahestina). Estes animais apresentam anemia microcítica, porém a absorção do ferro dietético é normal, ou seja, o ferro é absorvido, mas não é transferido para a corrente circulatória (VULPE, 1999). Estas informações subsidiam o entendimento dos casos de anemia que não respondem ao tratamento medicamentoso com ferro e sugerem que, neste caso, há necessidade de suplementação com múltiplos micro-nutrientes, em especial o cobre. A deficiência de cobre em ovelhas produz ataxia, mudanças na pigmentação dos pêlos, anemia, diarréia, perda de peso, com reflexo econômico negativo nesta atividade agroindustrial (LEÓN et al, 2000).

1.3.3 O cobre na forma de composto de coordenação

Os compostos de cobre altamente disponíveis são necessários no mundo todo como suplementos dietéticos para corrigir as deficiências causadas pela ingestão inadequada ou a baixa biodisponibilidade (LUO et al 1995).

A associação do cobre com proteínas ou com aminoácidos na formação de complexos quelados, foi sugerida, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do cobre (KRATZER; VOHRA, 1986), porém esta posição não é unânime, sendo questionadas as vantagens da utilização dos complexos quando comparado ao sulfato cúprico, na suplementação mineral em ruminantes (KINCAID, 1988 apud in LUO, 1996 p. 287). Apesar das divergências, o cobre complexado a aminoácidos tem sido extensivamente utilizado na nutrição animal (WAPNIR, 1998).

Em seu estudo utilizando proteinatos de cobre e cobre-lisina em programas de suplementação, HEMKEN (2006) concluiu que: 1) As deficiências de cobre ocorrem não somente devido a baixos níveis dietéticos de cobre, mas são freqüentemente causados pela interferência de altos níveis de molibdênio, ferro, zinco e outros compostos; 2) O suplemento de cobre deve fornecer cobre numa forma na qual seja altamente biodisponível; 3) Erros na suplementação de cobre, incluindo quantidades inadequadas, podem ser especialmente perigosas; 4) Formas orgânicas de cobre são recomendadas quando interferências com ferro e zinco são possíveis; e 5) Formas orgânicas, desde que sejam metabolizadas diferentemente das formas inorgânicas, podem ser benéficas.

Veum (2004) comparou proteinato de cobre com sulfato de cobre, em suplementação de porcos e observou um aumento na performance do crescimento dos porcos suplementados com proteinato de cobre e uma diminuição na excreção de cobre pelas fezes dos porcos suplementados com proteinato de cobre quando comparado aos suplementados com sulfato de cobre.

1.4 FERRO

1.4.1 Importância biológica do ferro

O ferro é um elemento essencial aos organismos vivos, é um dos metais mais amplamente utilizados por eles, participando de processos bioquímico-metabólicos vitais, tais como, síntese de DNA, RNA e proteínas, transporte de elétrons, respiração e proliferação celular, e regulação da expressão gênica (LIEU et al, 2001; GANZ, 2003). A atividade biológica do ferro está

relacionada às suas características químicas e ao estado de oxidação (Fe^{+2} ou Fe^{+3}), sendo capaz de doar ou receber elétrons, participando das reações de Fenton (WESSLING-RESNICK, 1999). No entanto, por esta mesma via, reação de Fenton, o ferro quando em excesso, pode gerar espécies altamente reativas de oxigênio, radicais $^{\bullet}OH^{-}$ e [O] (McCORD, 1998). Estes radicais podem produzir danos ao DNA, prejudicando a síntese de proteínas, lipídeos de membrana e carboidratos; ativação de proteases e alterações na proliferação celular (HALLIWELL & GUTERRIDGE, 1992; SMITH & YEOH, 1996).

Adicionalmente, o ferro livre pode reagir com ácidos graxos insaturados e induzir a peroxidação lipídica, provocando danos à integridade celular e morte celular (GERLACH et al., 1994; McCORD, 1998). Devido a este potencial reativo, tem sido atribuído ao ferro participação no desenvolvimento da carcinogênese, aterosclerose e de desordens neurodegenerativas tais como o Mal de Parkinson e Alzheimer (CONNOR et al., 1992; SOFIC et al., 1998).

Para evitar o potencial tóxico e atender às necessidades biológicas essenciais, os níveis de ferro no organismo devem ser rigorosamente controlados, pois tanto a deficiência quanto o excesso, alteram o equilíbrio bioquímico-fisiológico e possuem alta prevalência e significância clínica.

1.4.2 Deficiência de ferro

É a deficiência nutricional mais prevalente em todo o mundo, atingindo todas as faixas etárias, porém com maior incidência em recém-nascidos, crianças, mulheres em idade reprodutiva e gestantes (TORREJÓN et al, 2004; NEAD, 2004; BRUGNARA, 2004).

Apesar dos esforços empreendidos nas últimas 3 décadas (INAG, 1977) a deficiência nutricional de ferro continua sendo o problema de saúde mais freqüente em todo o mundo, com incidência maior nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (FREIRE, 1997; MERCK, 2006). Visto que dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 4 a 5 bilhões de pessoas no mundo, o que representa de 66 a 80% da população mundial apresentam deficiência em ferro, e cerca de 2 bilhões de pessoas, aproximadamente 30% da população mundial é anêmica devido, principalmente, à deficiência de ferro (WHO,2005).

A prevalência da anemia ferropriva é maior nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo estimado que 50% das mulheres grávidas sejam anêmicas. Nos países do Sul da Ásia a incidência chega a 80%. Nos países desenvolvidos a situação não é menos preocupante, ou seja, nos Estados Unidos, cerca de 7,8 milhões de mulheres e 700 mil crianças são deficientes em ferro e destas 3,3 milhões e 240 mil, respectivamente, são anêmicas. A prevalência da anemia em crianças nos primeiros 6 meses de vida é agravada devido ao aumento da gravidez na adolescência. Devido e freqüência e a severidade da anemia durante a gravidez o sistema público de saúde recomenda e fornece a suplementação com ferro, após o primeiro trimestre de gestação (TAPIERO, 2001).

A deficiência de ferro reduz a capacidade de trabalho e a cognição, com reflexo negativo na economia dos países onde a incidência é alta (WHO, 2005; SEN, 2006).

As principais causas da deficiência de ferro, principalmente nos países em desenvolvimento, estão relacionadas à baixa qualidade da dieta e biodisponibilidade do ferro (STOLTZFUS, 2001), e não necessariamente a uma dieta pobre em ferro (ALLEN & AHLUWALIA,1997). Nas áreas mais pobres, onde a anemia é mais freqüente, o consumo de ferro heme é baixo e a dieta usual consiste principalmente de vegetais não processados e ricos em inibidores da absorção do ferro (BIANCHI et al., 1992). Nestas condições, a absorção de outros micronutrientes (vitaminas A e B_{12}, riboflavina, zinco, cobre, cálcio) é afetada, contribuindo para a gravidade da anemia (BLOEN, 1995; ALLEN & AHLUWALIA,1997). Para reduzir os efeitos nocivos da deficiência de ferro, várias estratégias têm sido adotadas, entre outras, a suplementação medicamentosa com ferro.

A suplementação medicamentosa com ferro é recomendada para regiões onde a prevalência da anemia é alta e está baseada no enfoque terapêutico, utilizando altas doses de ferro, entre 0,5 e 3,0mg Fe/kg de peso corporal, preferencialmente por via oral, sendo o sulfato ferroso o composto de referência, o qual apresenta absorção irregular e incompleta (cerca de 10 a 20%) da dose administrada (REYNOLDS, 1997). Altas doses de ferro são freqüentemente associadas aos efeitos adversos (COOK et al., 1990; STEPHENSON, 1995) que atingem mais da metade da população que faz uso oral do sulfato ferroso, produzindo às vezes sintomas indesejáveis mais importantes que os relatados para a própria anemia e reduzindo a adesão ao tratamento (STEPHENSON, 1995). Com base nestes dados, novas estratégias para a prevenção e tratamento da deficiência de ferro têm sido avaliadas, entre elas, o desenvolvimento de novos compostos.

1.4.3 O Ferro na forma de composto de coordenação

A maioria dos aminoácidos em condições apropriadas reagem com o ferro formando complexos, porém estes são menos estáveis que os complexos de ferro com peptídeos relativamente grandes (ZHANG et al, 1990; KAPSOKEFALOU and MILLER, 1995).

Nem todos os quelatos de ferro são igualmente biodisponíveis. A quelação não garante a absorção e subseqüente metabolização do metal ferro (ASHMEAD, 2001).

Complexos quelatos de ferro bivalente com glicina (Ferrochel®) demonstraram ser estáveis e se mantêm na forma complexada em ampla faixa de pH, impedindo o ferro de formar complexos insolúveis com outros ligantes (GARCIA-CASAL, 2001). O complexo ferro-peptídeo (CHAUD, et al 2002) é um complexo de ferro com hidrolisado enzimático parcial de caseína, cujas características, diferem das características do sulfato ferroso, ou seja, é insolúvel em pH ácido, característico do estômago, e solúvel em pH de neutro a alcalino, característico do intestino. Porém em ambas as condições de pH o ferro permanece ligado. Quando insolúvel pH 5,0 é ferro é mobilizado por ligantes, como a cisteína. Em experimentos de reposição de hemoglobina, em ratos, o complexo foi tão eficiente quanto ao sulfato ferroso. Face a este comportamento, os autores concluíram, que no complexo a força de ligação deve ser suficientemente forte que impeça sua complexação com outros ligantes, porém que seja suficientemente fraca que possa ser mobilizado por carreadores presentes na parede os enterócitos.

1.5 MANGANÊS

1.5.1 Importância biológica do manganês

O manganês está presente em todos os tecidos dos mamíferos (TORRENTE et al, 2001). Este micronutriente tem importante papel na redução dos radicais livres, além de ser parte integrante da superóxido dismutase (MnSOD), a qual é caracteristicamente modificada em células cancerosas. (PABBRUWE, 2004; RICO et al, 2000).

O manganês não ocorre como metal livre na natureza, sendo encontrado em mais de 100 minerais dos quais os mais comuns são Pirolusita [MnO2], Rodocrosita [$MnSiO_3$] e Braunita [$3Mn_2O_3$. $MnSiO_3$]. Ocorre em 11 estados de oxidação nos quais 2, 4 e 7 são os mais importantes, predominando os tetravalentes na natureza (GERBER et al, 2002).

1.5.2 Deficiência de manganês

Os mecanismos pelos quais o manganês atua nos organismos vivos ainda não foram completamente elucidados, no entanto, estudos específicos sugerem sua participação em vários processos bioquímico-fisiológicos. CRITCHFIELD (1993) e TAKEDA (2003) demonstraram em indivíduos portadores de epilepsia, menores níveis sanguíneos de manganês quando comparado a não epiléticos. Por outro lado TORRENTE (2002), demonstrou que o excesso de manganês causa neurotoxicidade, porém o mecanismo molecular relacionado à toxicidade ainda não foi elucidado.

A deficiência de manganês também foi associada à redução da biossíntese de glicosaminoglicanas (YANG, 1998), alteração da estrutura e movimento rotacional das proteínas da HDL_2, com profundas alterações no metabolismo e transporte do colesterol em ratos (TAYLOR, 1997), além de redução do ganho de peso e anormalidades físicas (GONG et al, 1998).

Um caso de deficiência de manganês foi descrito em um voluntário que recebeu uma dieta contendo 0,1 mg/dia de manganês. Ele apresentou dermatite transitória, hipocolesterolemia e aumento nos níveis de fosfatase alcalina (MERCK, 2006).

1.5.3 O Manganês na forma de composto de coordenação

Diversos compostos orgânicos de manganês foram desenvolvidos e avaliados em nutrição animal durante os últimos 10 anos (LI et al, 2005).

Os complexos de minerais com compostos orgânicos devem ser estáveis o suficiente para manter o metal ligado nas condições do trato gastrintestinal, evitando a formação de complexos insolúveis. Porém a ligação deve ser o suficientemente fraca para possibilitar sua transferência para outras moléculas, possibilitando a sua absorção e metabolização (ASHMEAD, 1993 apud in LUO, 1999, p. 124).

Os complexos orgânicos de manganês devem ter força de ligação suficientemente forte para evitar seu deslocamento pelo cálcio e a formação de complexos insolúveis, os quais tem a biodisponibilidade prejudicada (LI et al, 2005).

1.6 ZINCO

1.6.1 Importância biológica do zinco

O zinco é segundo mineral mais abundante. É encontrado em todos aos organismos vivos (GRAY, 2003), sendo especialmente importante no metabolismo humano durante a fase de crescimento e na 3ª idade (RONZONI et al, 2001; CONTRERAS, 2002; TORREJÓN et al, 2004).

Dentre sua funções bioquímico-metabólicas, destaca-se como co-fator de inúmeras enzimas, metaloproteínas envolvidas na síntese e catabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005), e na regulação da resposta imune. A deficiência de zinco causa linfopenia e depressão de função dos linfócitos T e B (SALGUEIRO et al, 2000; REINHOLD, 1999). O zinco tem papel essencial na reprodução, pois é necessário para a síntese e secreção dos hormônios, luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), e na diferenciação gonodal, no crescimento testicular, na formação e maturação do espermatozóide e fertilização (SALGUEIRO et al, 2000; PRASAD, 2001).

Níveis reduzidos de zinco materno, durante fase gestacional e no desenvolvimento pós-natal, provocam alterações sutis no desenvolvimento neurológico no feto e da criança. (MERIALDI et al, 2004). Cuidados nutricionais envolvem a correção de deficiências antes da concepção e manutenção do estado adequado de zinco durante a gravidez, lactação e crescimento (GRANT, 2004).

O zinco está intimamente ligado ao metabolismo, sendo um componente essencial da matriz óssea, e necessário juntamente com o cálcio e fosfato para a consolidação da estrutura óssea (SALGUEIRO et al, 2002 a).

O excesso de zinco pode interferir com a absorção de ferro e cobre, produzindo anemia (GRAY, 2003).

1.6.2 Deficiência do zinco

A deficiência de zinco foi reconhecida pelas Nações Unidas a partir de 1997, sendo prevalente em países em desenvolvimento, onde a desnutrição e a mortalidade são altas (OSENDARP, 2001; HAMADAMI, 2002; GIBSON, 2000). A prevalência global de deficiência de zinco é de 31%, sendo as principais causas o acesso limitado a alimentos ricos em zinco e a abundância de inibidores da absorção de zinco, como o ácido fítico, muito comum em dietas baseadas em vegetais (WHO, 2005).

Em crianças com idade inferior a 5 anos a deficiência de zinco aumenta a incidência de diarréia, pneumonia e malária. A ocorrência destas doenças é maior na África e no Sudoeste Asiático, contribuindo substancialmente para a morbidade e mortalidade de crianças (CAULFIELD et al, 2004).

As principais características da deficiência severa de zinco em humanos é o retardo de crescimento, o atraso da maturação sexual e dos ossos, lesões de pele, diarréia, alopecia, prejuízo do apetite, o aumento da susceptibilidade a infecções mediadas via defeitos no sistema imune e o aparecimento de mudanças comportamentais. A redução do crescimento e prejuízos do sistema imune são sinais claramente demonstrados da deficiência

média de zinco em humanos (CAULFIELD et al, 2004; KING and KEEN, 1994 apud in HOUSE, 1999 p. 128; MERCK, 2006).

A biodisponibilidade varia com a composição química da fonte utilizada. O zinco é encontrado em grandes quantidades em cereais não refinados e em alguns legumes, os quais também possuem ácido fítico e fitatos em abundância que, com o zinco formam complexos insolúveis e, portanto, com biodisponibilidade reduzida. Esta é uma das principais causas da deficiência nutricional de zinco (SALGUEIRO, 2002 b).

Outras causas de deficiência de zinco incluem, disfunções genéticas ou metabólicas, como síndromes de má-absorção, acrodermatites enteropática, doença de Crohn, alcoolismo, cirrose hepática, doenças renais, ou por causas nutricionais, como a diminuição da ingesta de zinco ou consumo de alimentos pobres em zinco (SALGUEIRO et al, 2000; EVANS et al, 2004).

1.6.3 O Zinco na forma de composto de coordenação

O zinco é comumente suplementado nas dietas para animais devido ao fato de grande parte dos ingredientes dos alimentos naturais serem marginalmente deficientes em zinco. A indústria alimentícia tem aumentado a oferta suplementos contendo minerais nos últimos 10 anos (CAO, 2002).

A biodisponibilidade do zinco a partir dos complexos orgânicos varia de acordo com o ligante (SPEARS, 2004). Nas fontes dietéticas, a biodisponibilidade do zinco tem sido associada ao conteúdo de metionina (HUNT et al, 1987), porém o complexo zinco-metionia não é absorvido na forma intacta (HILL et al, 1987; HEMPE; COUSINS, 1989).

Diante do exposto, a importância dos minerais para a manutenção do equilíbrio bioquímico-nutricional é incontestável. No entanto, as bases

moleculares envolvidas na homeostase (absorção, distribuição, utilização e eliminação) destes elementos ainda não foram completamente elucidadas. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a forma de apresentação dos minerais tem papel decisivo na biodisponibilidade dos mesmos, sendo que aqueles naturalmente complexados com proteínas, ferritina (THEIL, 2004), hemoglobina (LAYRISSE et al, 1984) ou sintetizados com proteínas (CREMONESI et al., 1984; PAGELLA et al., 1984), aminoácidos (FRAZONE et al., 1990), ou hidrolisados parciais de proteína (CHAUD et al, 2002), tem demonstrado maior biodisponibilidade e menores efeitos colaterais, quando comparados aos compostos inorgânicos.

Assim, estamos estendendo o estudo de preparação e avaliação de complexos de minerais com hidrolisados parciais de proteína. Nesta extensão avaliamos a viabilidade de utilização de outra fonte protéica para obtenção do hidrolisado, e a complexação com outros minerais. A opção de utilização de proteínas de soja está baseada na disponibilidade comercial da mesma em nosso país. E a redução de custo torna imperativa, pois além da área humana, estes compostos têm grande potencial de uso em áreas não menos importante como a veterinária.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Preparação e caracterização físico-química de complexos de minerais com hidrolisados parciais de isolados protéicos de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparação do hidrolisado parcial de proteína de soja.
2. Caracterização do hidrolisado parcial de proteína de soja.
3. Preparação dos complexos (ferro, cobre, manganês e zinco) a partir de hidrolisado parcial.
4. Caracterização físico-química dos complexos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Proteínas isoladas de soja (IPS) (samposoy) de teor protéico 99,9% foram adquiridas da Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos; Enzima proteolítica, Aranzime Bruta. Neutrase e Alcalase, Novozymes. Superdex Peptide HR 10/30, Pharmacia (Uppsala, Swedem). Todos os outros reagentes foram grau analítico ou equivalente.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação dos hidrolisados ácidos parciais de isolado protéico de soja (IPS)

Na preparação dos hidrolisados ácidos parciais, foram utilizadas, dispersões de IPS (Isolado Protéico de Soja) 10% (p/v), em solução de ácido sulfúrico ou clorídrico 3M. As dispersões foram mantidas sob agitação à temperatura de 80±2°C, por um período de tempo de 3, 6 ou 9 horas. Após esse período, a fração solúvel foi separada por filtração e seca por liofilização. A fração retida no filtro foi seca em estufa até peso constante.

3.2.2 Preparação do hidrolisados enzimáticos parciais de IPS

3.2.2.1 Aranzime

Os hidrolisados parciais de IPS, foram preparados de acordo com o método descrito por FREITAS (1993). Dispersões aquosas de IPS 10% (p/v), após correção do pH para 7,0 ± 0,2 com solução de hidróxido de amônio, foram incubadas á 37±2ºC. Após equilibrada a temperatura foi adicionada a enzima em porcentagem relativa a proteína de 1,8%, 3,6% e 5,4% (m/m), respectivamente nos tempos 0, 9 e 18, e tempo de incubação de 9, 18 ou 27 horas. A reação de hidrólise foi interrompida por aquecimento a 100ºC num período de 30 minutos. Após o tempo de incubação, a fração solúvel foi separada por filtração e seca por liofilização. A fração retida no filtro foi seca em estufa até peso constante.

3.2.2.2 Neutrase

O hidrolisado parcial de IPS com neutrase, foi realizado de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. À dispersão de proteína de soja 10% (m/v), pH ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio, foi adicionado 0,8% enzima (m/m) em relação à proteína. A dispersão foi mantida sob agitação constante por 4 horas à temperatura de 50±5°C. Após o período de hidrólise, a enzima foi inativada por aquecimento da dispersão a 85°C por um período de 10 minutos. Após a neutralização, a fração solúvel foi separada por filtração e seca por liofilização. A fração retida no filtro foi seca em estufa até peso constante.

3.2.2.3 Alcalase

O hidrolisado parcial de IPS com alcalase foi realizado de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. À dispersão de proteína de soja 10% (m/v), pH ajustado para 8,0 com solução de hidróxido de sódio, foi adicionado 0,8% enzima (m/m) em relação à proteína. A dispersão foi mantida sob agitação constante por 4 horas à temperatura de 60±5°C. Após o período de hidrólise, a enzima foi inativada por aquecimento da dispersão a 85°C por um período de 10 minutos. Após a neutralização, a fração solúvel foi separada por filtração e seca por liofilização. A fração retida no filtro foi seca em estufa até peso constante.

3.2.3. Avaliação do rendimento do processo

1-(A/B)x100 = rendimento do processo (%)

(A) representa a massa do material retido no filtro após secagem até peso constante.

(B) representa a massa de proteína submetida à hidrólise.

3.2.4. Caracterização dos hidrolisados

3.2.4.1.Estimativa da distribuição de tamanho dos peptídeos

Foi utilizado um sistema de FPLC ("Fast Performance Liquid Chromatography"), utilizando a coluna Superdex Peptide HR 10/30 como fase estacionária e Acetonitrila 30% e TFA 0,1% como fase móvel, com fluxo de 0,5mL/min e detecção dos compostos eluídos no comprimento de onda (λ) de 214nm. Os equipamentos utilizados foram HPLC Pharmacia LKB-LCC 2252, Bombas A e B Pharmacia LKB-HPLC pump 2248, válvula de injeção Rheodyne (manual), detector Pharmacia LKB-VWM 2141, coletor Pharmacia LKB-FRAC 200 e registrador Pharmacia LKB-REC 102. A coluna foi previamente padronizada com albumina (marcador do volume de exclusão) e mistura de aminoácidos, conforme descrito em SMYTH and FITZGERALD, 1997.

3.2.5 Método de Preparação do complexo Peptídeo-Mineral

O complexo peptídeo-mineral foi preparado de acordo com método descrito por CHAUD et al (2002), o qual foi utilizado para a preparação do complexo de ferro com hidrolisado parcial de caseína.

À dispersão aquosa contendo 10% (m/v) de hidrolisado, mantida sob agitação constante a temperatura ambiente (25ºC), foi adicionado lentamente o sal inorgânico de um dos minerais. O final da complexação foi acompanhado por titulação potenciométrica, voltametria cíclica ou reação colorimétricas.

Na voltametria cíclica é realizada a varredura do potencial direto e inverso em vários ciclos sucessivos, observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. Se houver adsorção do metal no eletrodo, os picos catódicos e anódicos irão crescer a cada varredura (apenas para o metal manganês), até que haja saturação na superfície do eletrodo. Este crescimento irá ocorrer no mesmo potencial se o sistema for reversível, isto é, se a quantidade de cargas envolvidas nas varreduras catódicas e anódicas forem idênticas (CANTANE, 2004).

3.2.6 Caracterização físico-química do complexo peptídeo-mineral

3.2.6.1. Quantificação do metal ligado aos peptídeos

Após a separação do complexo dos outros constituintes da dispersão e secagem, a quantidade percentual do metal ligado foi determinada por absorção atômica, após digestão ou calcinação do composto.

3.2.6.2 Avaliação do sítio de ligação

A avaliação do sítio de ligação foi feita por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e na região do infravermelho próximo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de aprimorar o processo de obtenção de complexos de minerais com hidrolisados parciais de proteína passíveis de serem utilizados como suplementos nutricionais na área humana e veterinária. Como já mencionado na introdução, os complexos orgânicos de minerais geralmente proporcionam maior biodisponibilidade do mineral, no entanto, seu custo é maior, quando comparado à forma inorgânica. Portanto para utilização em grande escala, como por exemplo, a fortificação da farinha de trigo com o Ferro, para o consumo humano ou a fortificação do sal mineral para consumo animal, é necessário que os compostos tenham não só viabilidade funcional, mas também econômica. Neste sentido, utilizamos como fonte protéica o IPS (Isolado Protéico de Soja) em substituição a caseína cujos preços no mercado internacional giram em torno de US$ 6.25 e 12.25, respectivamente.

Um dos passos limitantes no desenvolvimento de complexo de minerais com peptídeos é a obtenção de hidrolisados parciais de proteína que sejam adequados para a complexação e a custos aceitáveis. Com base nestas condições avaliamos a preparação de hidrolisados utilizando três diferentes métodos.

4.1. PREPARAÇÃO DO HIDROLISADO PARCIAL DA PROTEÍNA DE SOJA

A hidrólise ácida (HCl ou H_2SO_4) foi conduzida em condições brandas (3,0M do ácido e temperatura de 80ºC) visando, se apropriada, a

transferência de escala, pois a utilização de solução ácida mais concentrada e temperatura mais elevada exigem a utilização de reatores de vidro. Nas condições utilizadas é possível utilizar reatores de policarbonato.

As condições de hidrólise e o rendimento em compostos solúveis são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento do processo de hidrólise com H_2SO_4 e com HCl, (massa retida no filtro/massa de proteína x 100).

TIPO DE HIDRÓLISE	Tempo de Hidrólise (horas)	Proteína (g)	Rendimento
Ácida com H_2SO_4	3	10,00	**58,54%**
Ácida com H_2SO_4	6	10,00	**59,62%**
Ácida com H_2SO_4	9	10,00	**60,76%**
Ácida com HCl	3	10,00	**37,95%**
Ácida com HCl	6	10,00	**49,95%**
Ácida com HCl	9	10,00	**44,09%**

A hidrólise da proteína com o ácido sulfúrico foi mais eficiente quando comparada ao ácido clorídrico em termos de compostos solúveis, independente do tempo de hidrólise. Esta maior eficácia do ácido sulfúrico pode ser atribuída à concentração de íons hidrogênio, pois o ácido sulfúrico, em água libera dois equivalentes em hidrogênio enquanto que o ácido clorídrico libera somente um.

Para ambos os ácidos, após o processo de hidrólise é necessário a neutralização do ácido, o qual foi feito pela adição de hidróxido de sódio. Nestas condições há formação de sal (cloreto de sódio) no Hidrolisado obtido com ácido

clorídrico, o qual se não removido limitaria o uso do Hidrolisado em seres humanos, mas não para animais, uma vez que os suplementos são adicionados ao sal mineral. Para o caso do Hidrolisado com ácido sulfúrico tentamos a neutralização hidróxido de cálcio com o intuito de formar sulfato de cálcio, o qual devido à baixa solubilidade precipitaria no meio, possibilitando não só a neutralização, mas também uma purificação inicial. No entanto, com este procedimento a quantidade de material recuperado foi muito reduzido inviabilizando o processo.

Outro inconveniente da hidrólise ácida foi à formação de compostos solúveis de coloração escura (de âmbar a negra) tornando o hidrolisado pouco atraente, necessitando, portanto, de processo adicional de clarificação.

No processo de hidrólise enzimática, o rendimento em compostos solúveis foi similar ao obtido no processo de hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico e superior ao obtido com o ácido clorídrico, destacando o hidrolisado obtido com Neutrase (Tabela 2).

Tabela 2 – Condições e rendimento do processo de hidrólise enzimática (massa retida no filtro/massa de proteína x 100).

ENZIMA	% de enzima	Nº de adições da enzima	Tempo de hidrólise (horas)	Temperatura (ºC)	Rendimento
Aranzime	1,8	1	9	37±3	**61,10%**
Aranzime	3,6	2	18	37±3	**58,91%**
Aranzime	5,4	3	27	37±3	**52,46%**
Neutrase	0,8	1	4	60±3	**73,96%**
Alcalase	0,8	1	4	85±3	**69,81**

A redução na quantidade de compostos solúveis, hidrolisados obtidos com Aranzime, nos tempos de 18 e 27 horas com duas ou três adições de enzima 1,8%, pode ser atribuído ao processo de transpeptidação.

Tempos reduzidos de hidrólise são favoráveis, tanto pela redução de custos, quanto pela possibilidade de crescimento de microorganismos. Além disso, o hidrolisado obtido tem coloração característica, e se houver aminoácidos livres estes estarão na forma (L), portanto, bioutilizáveis, o que não ocorre na hidrólise ácida, onde os aminoácidos livres estão na forma de mistura racêmica (D e L), além de não necessitar de neutralização pós-hidrólise.

Todos os processos de hidrólise foram feitos em escala laboratorial (10g), e os hidrolisados secos por liofilização.

4.2 Caracterização do Hidrolisado Parcial da Proteína de Soja

A coluna foi calibrada com padrões de diferentes pesos moleculares conforme demonstrado na figura 1 e na tabela 3.

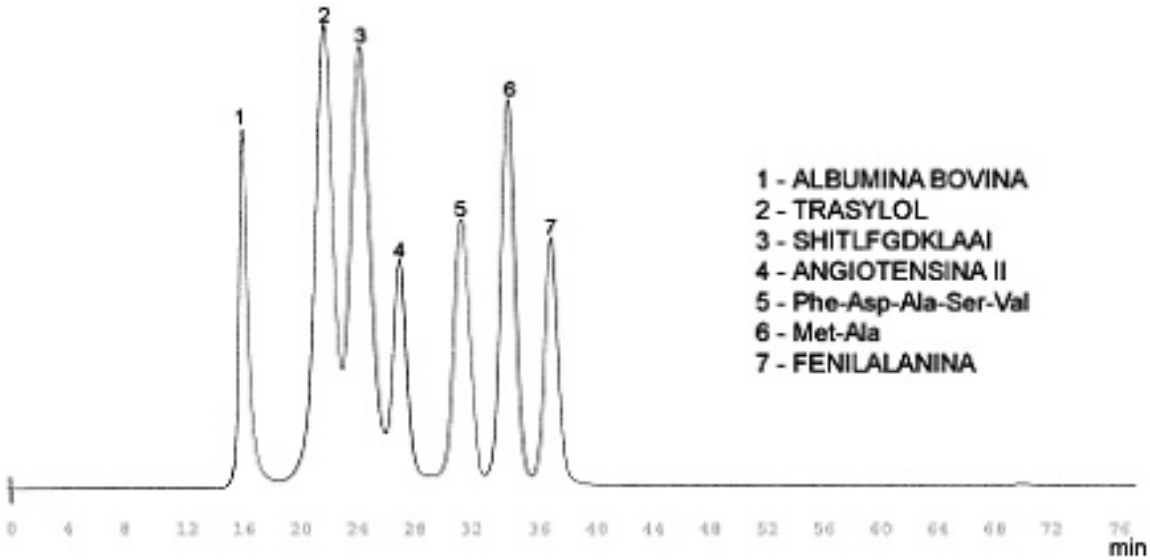

Figura 1 – Perfil de eluição dos padrões utilizados na calibração da coluna Superdex Peptide HR 10/30 (fase estacionária), Acetonitrila + TFA 0,1% (fase móvel), detecção em UV a 214 nm num fluxo de 0,5mL/min.

O perfil de eluição dos padrões mostra uma boa discriminação possibilitando a separação do dipeptídeo (Met-Ala) do aminoácido (Phe).

Tabela 3 – Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide HR 10/30.

PADRÃO	Peso Molecular (Da)	Concentração	Massa
ALBUMINA BOVINA	66.000	0,45 µg/ µL	45 µg
TRASYLOL	6.500	0,45 µg/ µL	45 µg
SIHTLFGDKLAAI	1.623	0,45 µg/ µL	45 µg
ANGIOTENSINA II	1.046	0,23 µg/ µL	23 µg
Phe-Asp-Ala-Ser-Val	537	0,45 µg/ µL	45 µg
Met-Ala	220	0,73 µg/ µL	73 µg
FENILALANINA	165	0,23 µg/ µL	23 µg

Após a calibração da coluna com os padrões, foram realizadas eluições de Proteína Isolada de Soja Intacta diluída nos seguintes solventes: solução de HCl 3M, de H_2SO_4 3M, de NH_4OH. Os perfis de eluição são apresentados na figura 2.

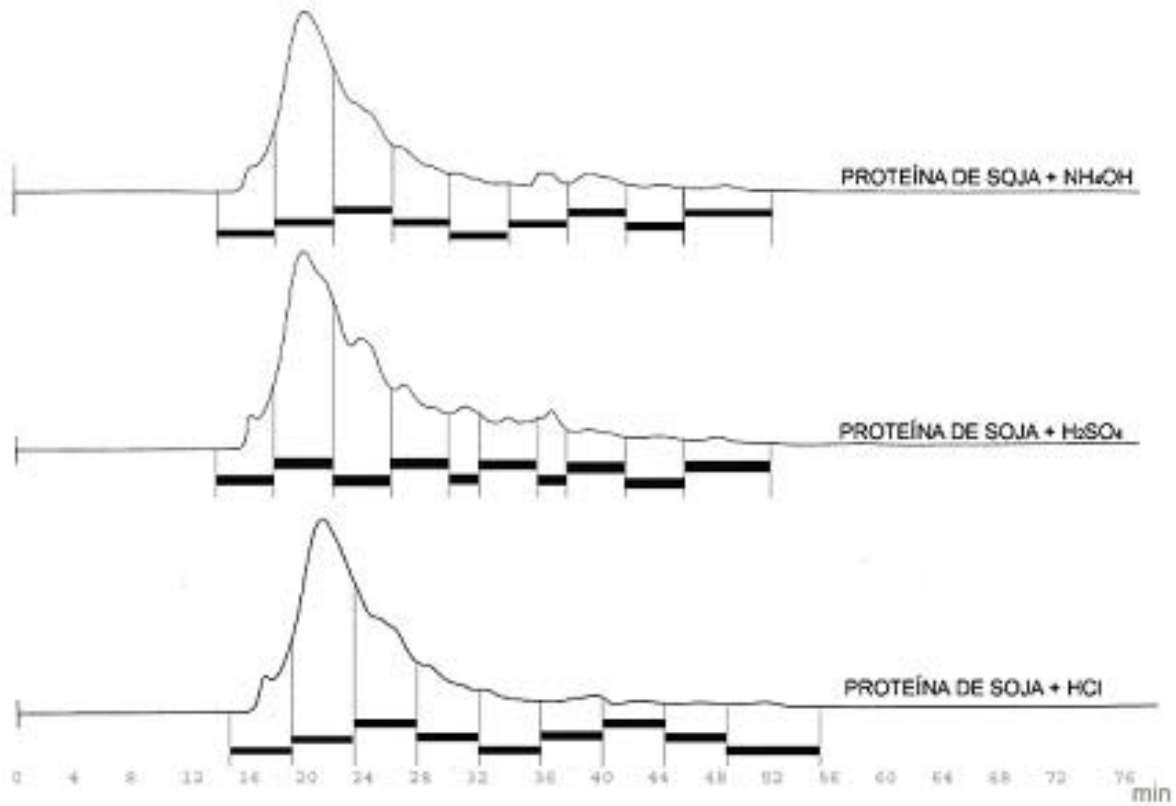

Figura 2 – Perfis de eluição da proteína intacta, diluída nos diferentes solventes (H_2O + NH_4OH, H_2SO_4 e HCl) utilizados no processo de hidrólise.

A hidrólise com HCl ocorreu nos tempos de 3, 6 e 9 horas. Na figura 3 podemos visualizar e comparar os cromatogramas dos Hidrolisados protéicos obtidos com HCl 3,0M obtidos nos diferentes tempos de hidrólise.

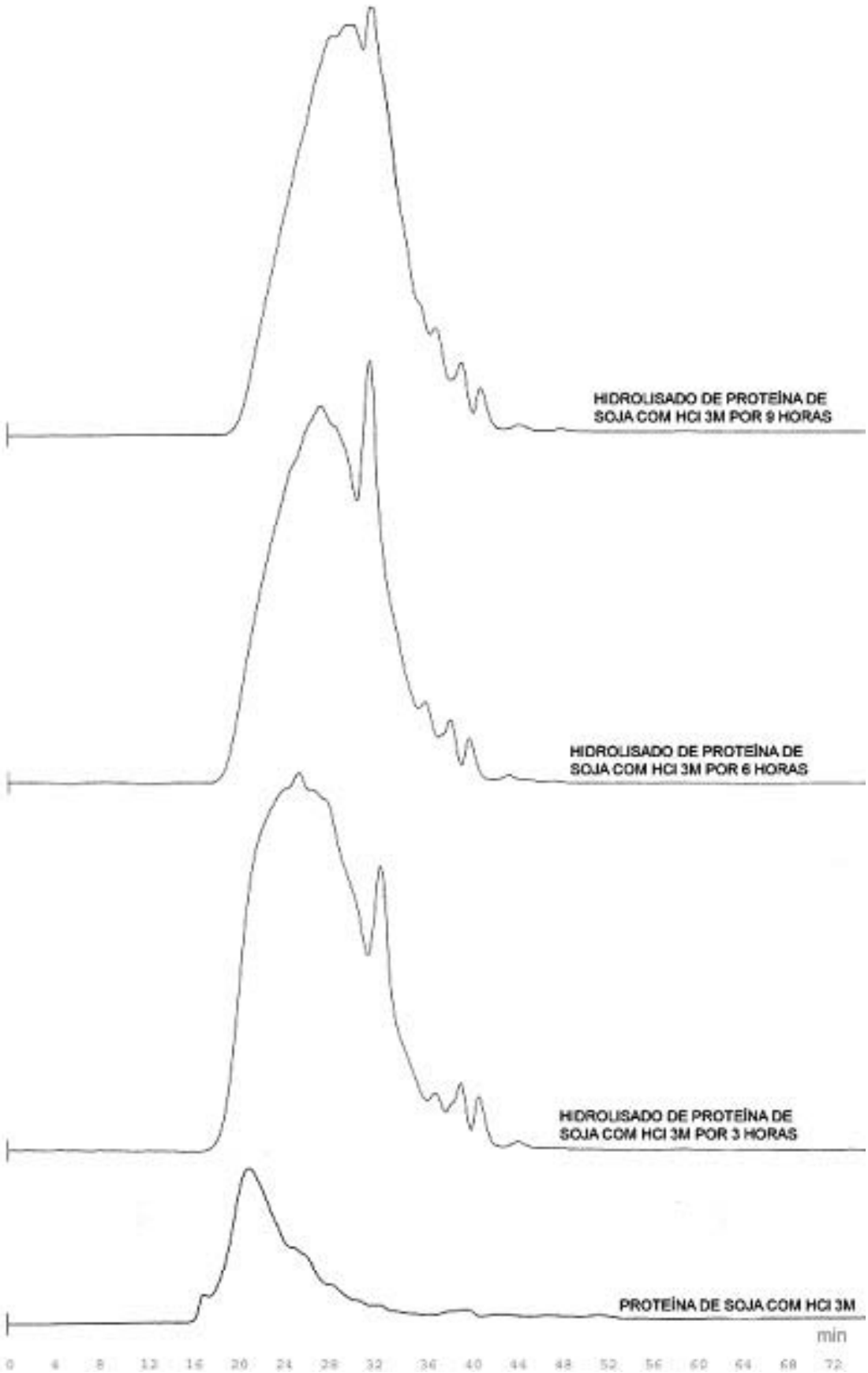

Figura 3 – Perfil de eluição dos Hidrolisados protéicos obtidos com HCl 3,0M.

Houve pouca alteração na distribuição no peso molecular do substrato (IPS) para o hidrolisado parcial, o que indica que grande parte da proteína foi convertida em peptídeos de peso molecular considerado elevado, estando entre o Trasylol (PM = 6.500 Da) e o pentapeptídeo Phe-Asp-Ala-Ser-Val (PM = 537 Da). Para melhor visualização ver figura 4.

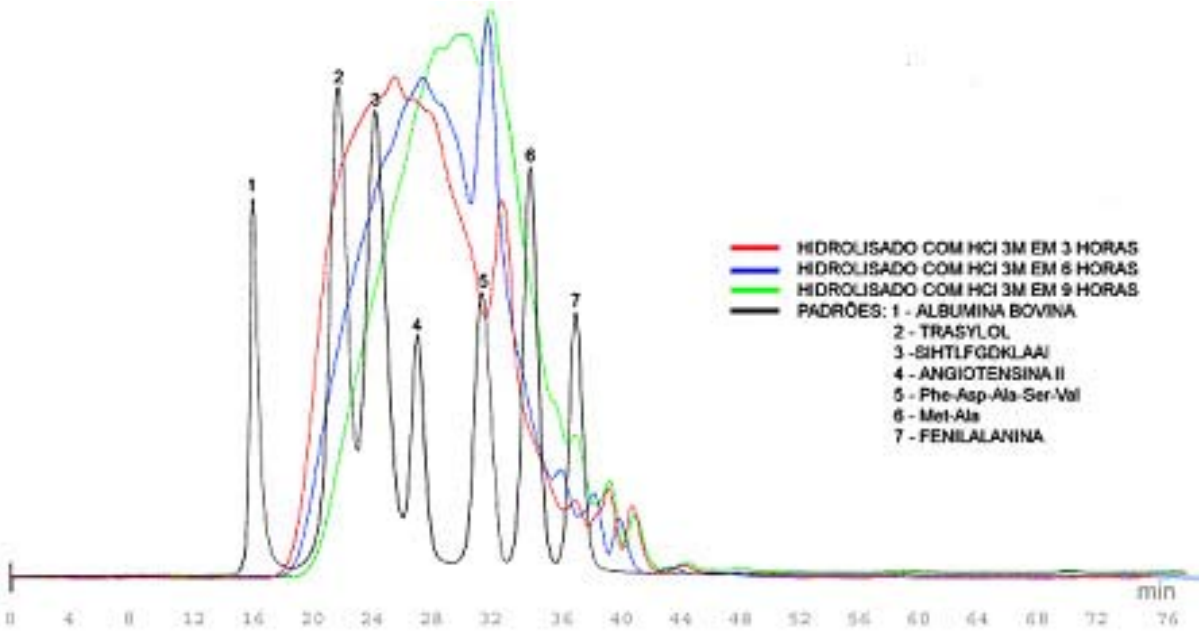

Figura 4 – Comparação entre o perfil de eluição dos padrões e dos Hidrolisados obtidos com HCl 3,0M nos tempos: 3, 6 e 9 horas.

Na figura 5, foi sobre posto as figuras referentes a eluição da proteína intacta e dos Hidrolisados obtidos com HCL 3M. A diferença entre o perfil de eluição da proteína intacta e dos hidrolisados mostra grande contribuição de proteínas intactas ou grandes peptídeos e pequena contribuição de peptídeos de peso molecular menor, independente do tempo de hidrólise. Esses dados sugerem que as condições utilizadas não foram adequadas para produzir pequenos peptídeos.

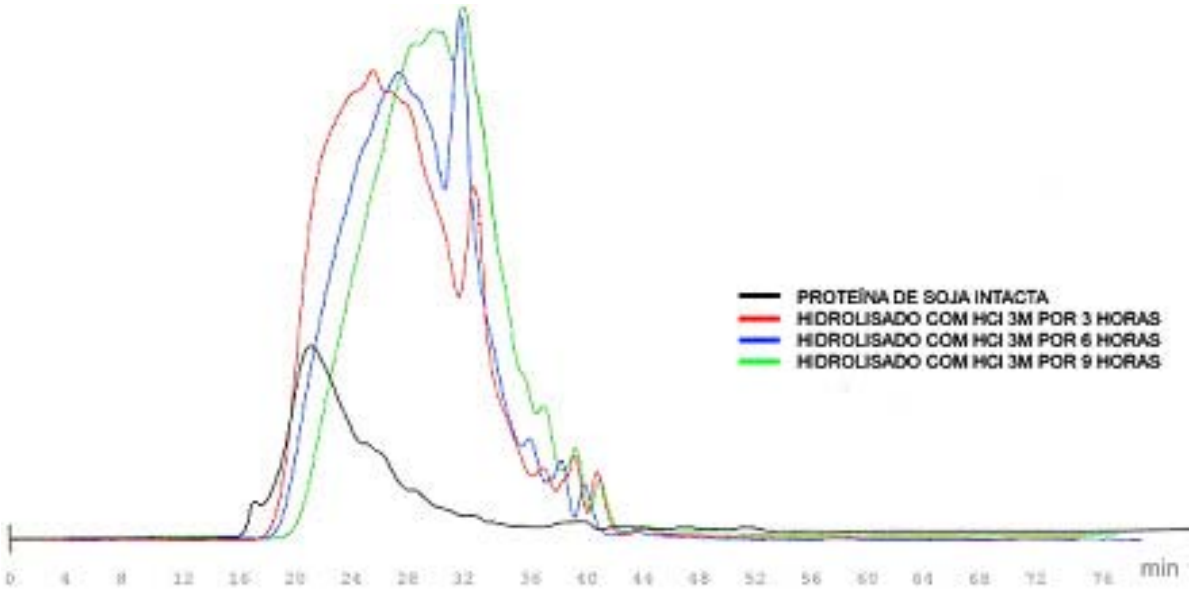

Figura 5 – Comparação do perfil cromatográfico da proteína intacta com os Hidrolisados obtidos com HCl 3,0M.

Os perfis de eluição dos hidrolisados obtidos com ácido sulfúrico nas diferentes condições experimentais são apresentados na figura 6, onde pode ser sugerido que o aumento do tempo de hidrólise conduz a uma redução nos componentes de maior peso molecular.

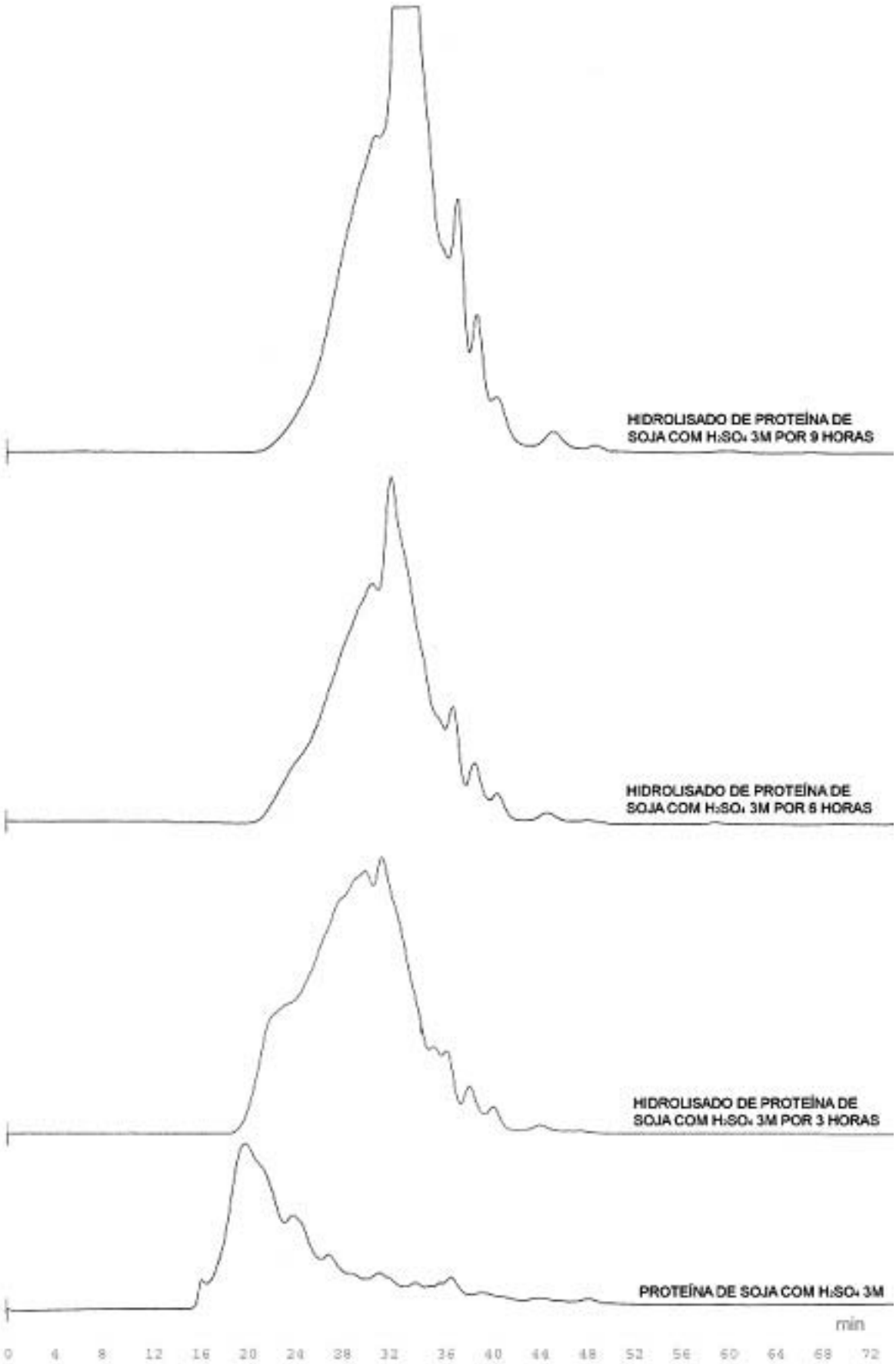

Figura 6 – Perfil de eluição dos Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.

Para facilitar a visualização, a figura 7 apresenta os cromatogramas sobrepostos, a qual mostra que os produtos da hidrólise são detectados em região posterior a eluição da proteína, ou seja a composição do hidrolisado foi deslocada da região de maior peso molecular para a de menor peso molecular, quando comparado a proteína intacta e ao hidrolisado obtido com ácido clorídrico.

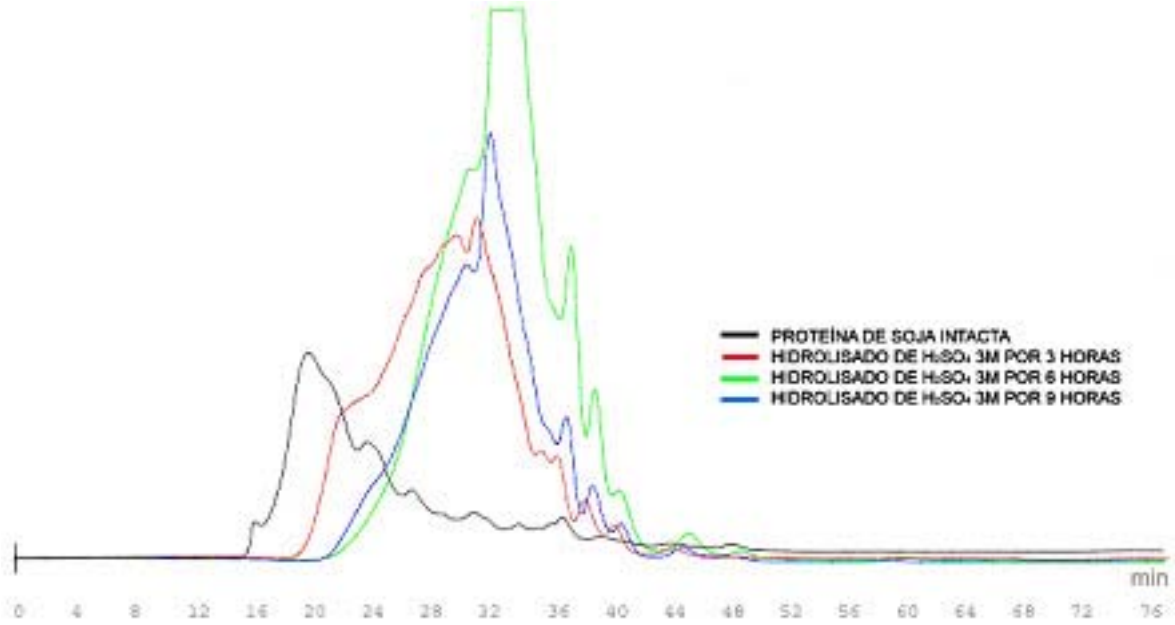

Figura 7 – Comparação do perfil cromatográfico da proteína intacta com os Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.

Comparando o perfil de eluição dos padrões com o perfil de eluição dos hidrolisados, verificamos que na hidrólise com o ácido sulfúrico há maior contribuição relativa de peptídeos de pequeno peso molecular, cujos valores de peso molecular aproximados estão entre o pentapeptídeo Phe-Asp-Ala-Ser-Val (PM = 537 Da) e o aminoácido fenilalanina (PM = 165 Da), figura 8. Portanto, a hidrólise com o ácido sulfúrico pode ser considerada mais eficiente quando comparada ao ácido clorídrico, tanto no rendimento em peptídeos solúveis quanto para a obtenção de maior proporção de pequenos peptídeos.

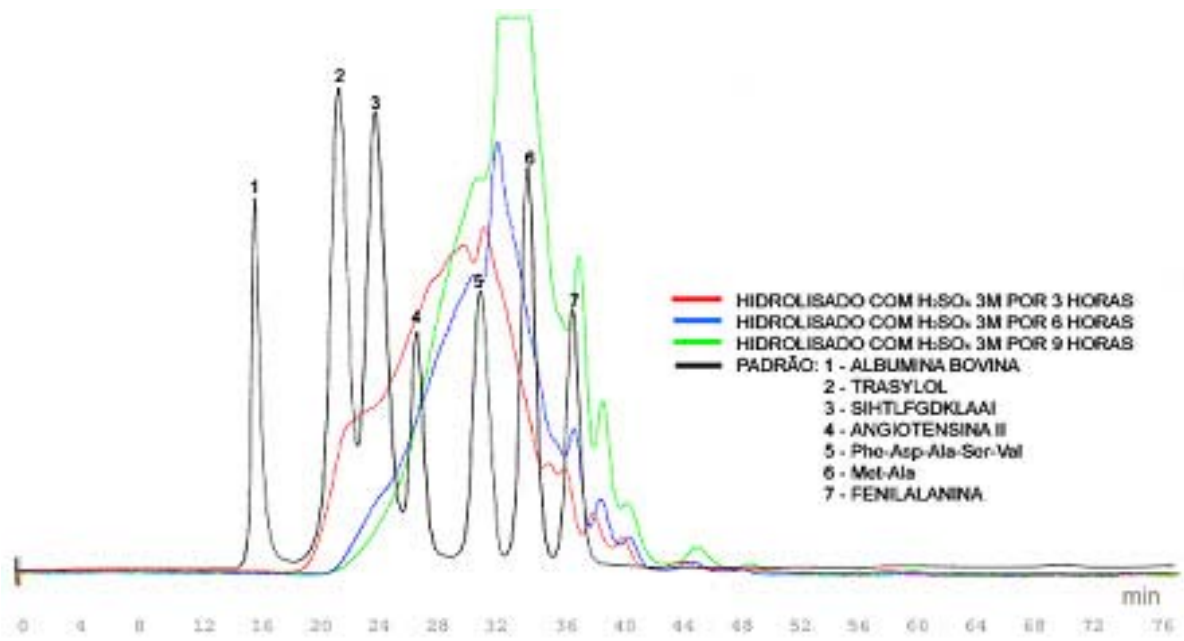

Figura 8 – Comparação entre o perfil de eluição dos padrões e dos Hidrolisados obtidos com H_2SO_4 3,0M.

Os perfis de eluição dos hidrolisados obtidos com ácido clorídrico nas diferentes condições experimentais são apresentados na figura 3, onde pode ser sugerido que a fração de alto peso molecular tem maior contribuição quando comparado aos hidrolisados obtidos com ácido sulfúrico.

Assim, o menor rendimento pode ser atribuído a menor eficiência no processo de hidrólise, podendo ser visualizada no figura 9.

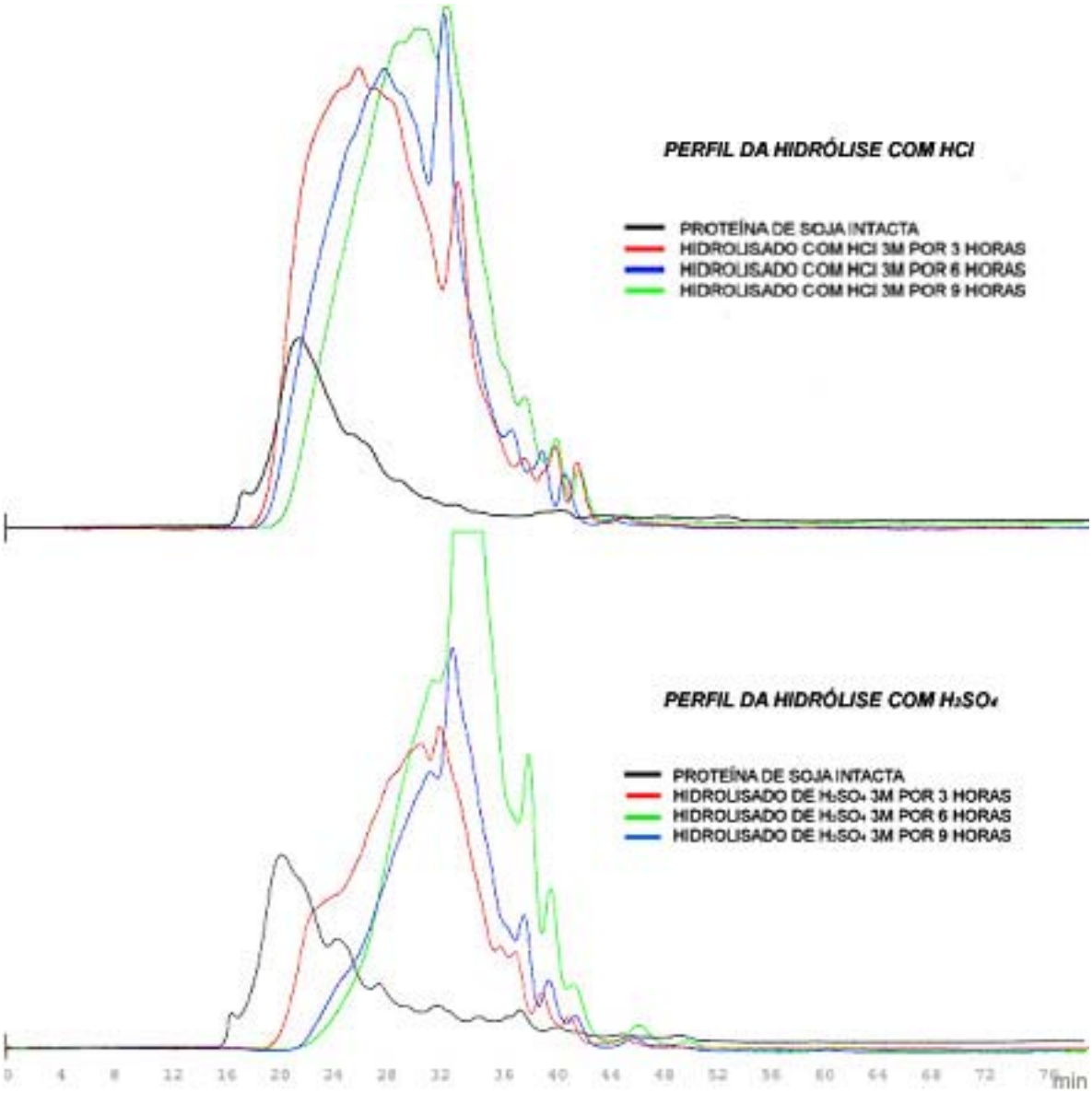

Figura 9 – Comparação dos Perfis de dos Hidrolisados obtidos com HCl e H_2SO_4 3,0M.

Os hidrolisados preparados por hidrólise enzimática, utilizando Aranzime nos diferentes tempos estão apresentados na figura 10. A comparação do perfil de eluição da proteína intacta com os hidrolisados, mostra que a hidrólise foi eficiente e conduziu à obtenção de peptídeos de menor peso molecular quando comparado à hidrólise ácida. Não havendo alteração do perfil do hidrolisado nos diferentes períodos de incubação (9, 18 e 27 horas).

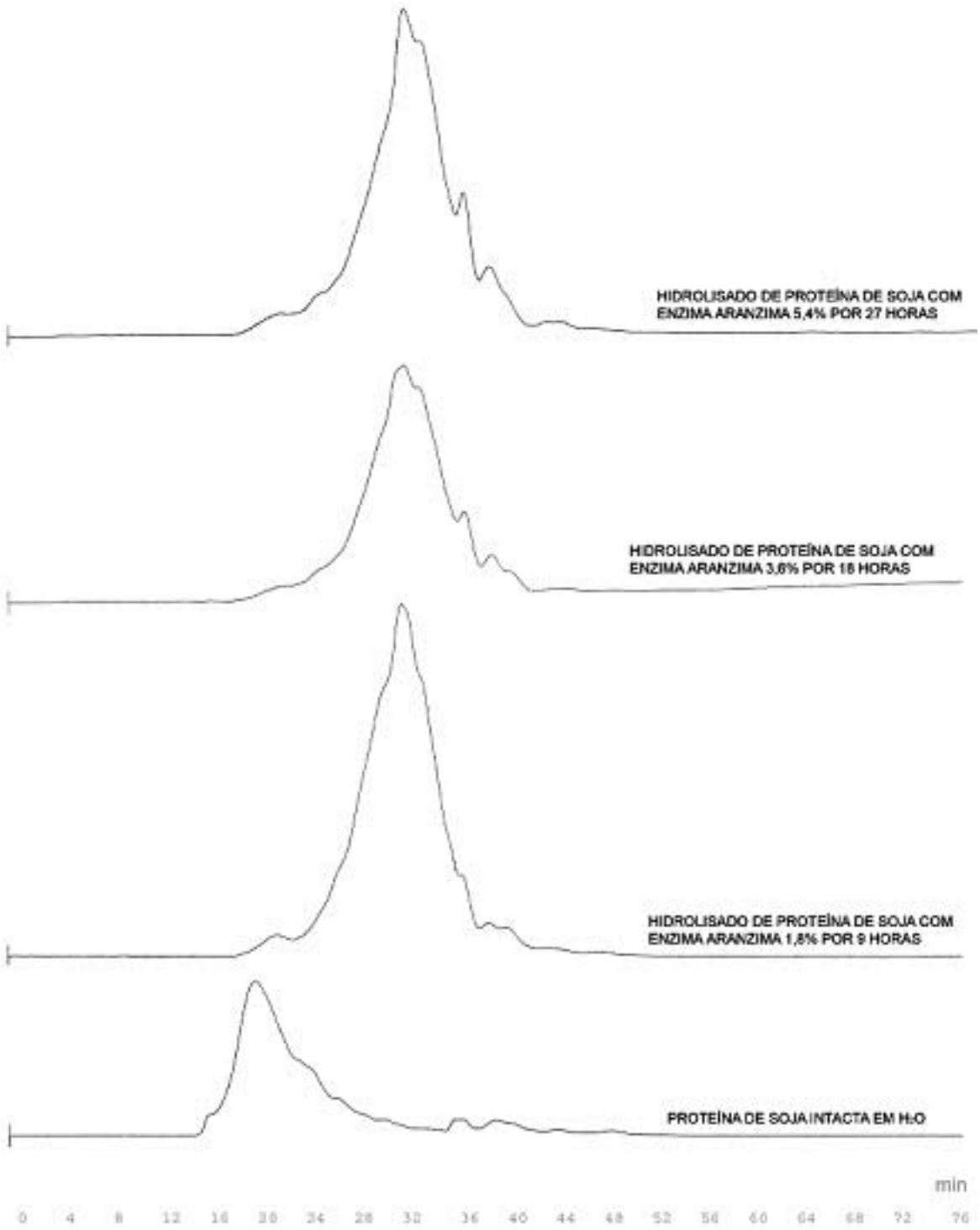

Figura 10 – Perfil de Hidrólise enzimática da Proteína de Soja com Aranzime.

Estas informações podem ser melhor visualizadas na figura 11, a qual mostra que a maior parte dos componentes do hidrolisado eluiram fora do volume de eluição da proteína intacta. A comparação com os volumes de eluição dos padrões mostra que a maioria dos peptídeos está na faixa entre 5 e 2

resíduos de aminoácidos, ou seja entre 537Da (equivalente ao pentapeptídeo Phe-Asp-Ala-Ser-Val) e a 220Da (equivalente ao dipeptídeo Met-Ala). Podemos também verificar que não houve grandes diferenças no produto da hidrólise em relação à concentração enzimática.

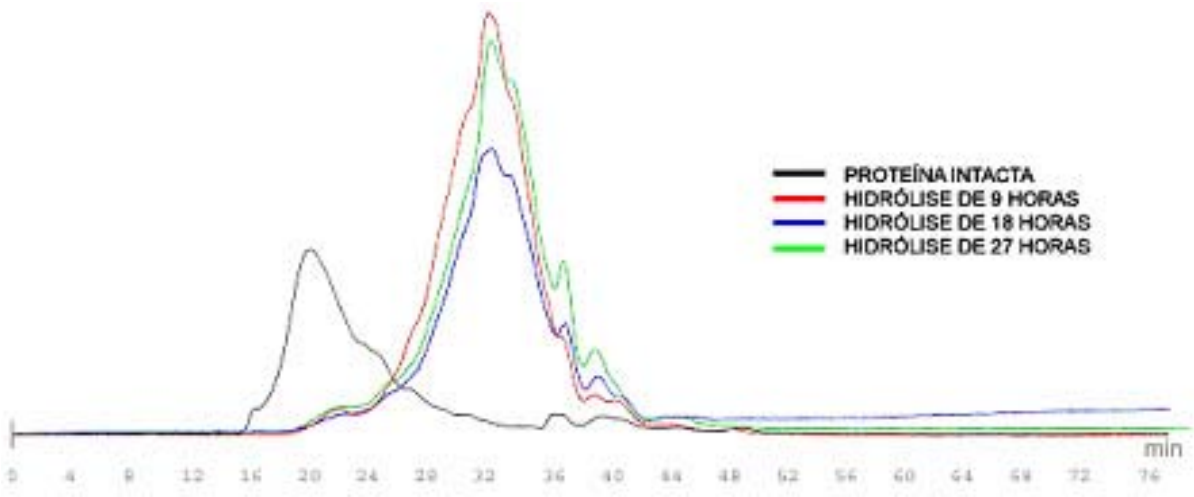

Figura 11 – Perfil de eluição da proteína intacta e os respectivos Hidrolisados obtidos com Aranzime (1,8%, 3,6% e 5,4)%.

Com base nestes resultados, consideramos a melhor condição como sendo a correspondente a 9,0 horas de incubação de Aranzime a uma porcentagem enzima-substrato de 1,8% (p/p). Estas condições contrastam com as descritas por Freitas et al (1993) que, utilizando como proteína a caseína e Pancreatina e Protomix® como mistura enzimática, obteve melhores condições de hidrólise com três adições de enzima (5,4%) e tempo de hidrólise de 17 horas.

A figura 12 nos mostra o perfil de eluição do hidrolisado preparado com a enzima Neutrase, cuja análise comparativa com os padrões mostra que parte eluiu em peso molecular correspondente entre a Angiotensina II, que possui peso molecular de 1.046Da, e dipeptídeos como Met-Ala, que possui peso molecular igual a 220Da, embora podemos notar fração de tamanho equivalente ao da Phe, que possui peso molecular de 165Da. Porém, com uma fração considerável eluída na faixa de eluição da proteína.

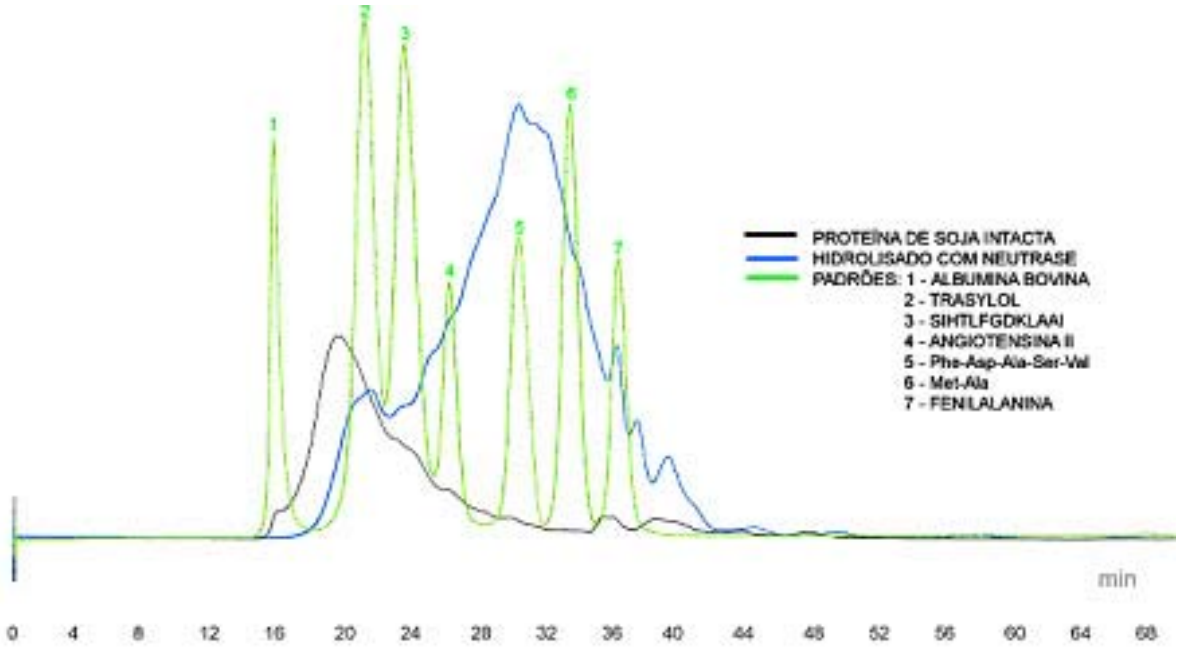

Figura 12 – Comparação do Perfil de Hidrólise de Proteína de Soja utilizando Enzima Neutrase com os perfis dos padrões e da Proteína de Soja intacta.

Com base nestes dados, a hidrólise com Aranzime seria mais eficiente do que com a Neutrase, pois a primeira conduz a obtenção de peptídeos menores.

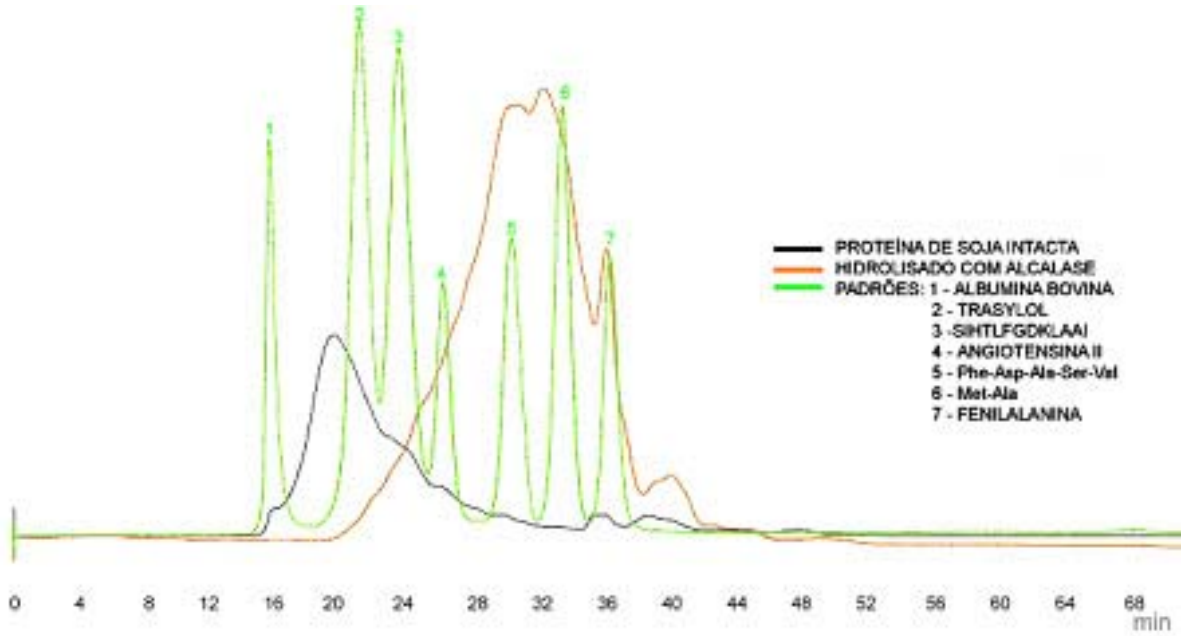

Figura 13 – Comparação do Perfil de Hidrólise de Proteína de Soja utilizando Enzima Alcalase com os perfis dos padrões e da Proteína de Soja intacta.

O resultado da hidrólise enzimática com Alcalase é mostrado na figura 13, e apresenta perfil de eluição similar ao obtido com a Aranzime, ou seja maior contribuição de peptídeos abaixo de 5 resíduos de aminoácidos.

Considerando que o objetivo da hidrólise é aumentar o número de grupos carboxílicos passíveis de se complexarem com os metais em estudo, o processo mais eficiente seria a hidrólise com Aranzime, no entanto esta enzima ainda não foi aprovada para uso em alimentos destinados ao consumo humano. Assim a opção seria a enzima Alcalase, que tem registro para uso alimentar. Sendo descartada a possibilidade de uso dos Hidrolisados ácidos.

4.3 PREPARAÇÃO DO COMPLEXO PEPTÍDEO-MINERAL

4.3.1 Reação de complexação da solução do Hidrolisado de proteína de soja 10% com os metais Cu, Fe, Mn e Zn.

Tabela 4 – Quantidade estimada de metal a ser complexado com o Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%

SAL	Massa do Metal (mg)	Massa do Sal (mg)	Solução Metal 0,5M (mL)
$CuCl_2$	317,73	852,24	10,0
$FeCl_3$	279,23	1.351,6	10,0
$MnCl_2$	274,69	989,5	10,0
$ZnCl_2$	326,95	681,4	10,0

A quantidade em mg de metal que reagiria com a solução do Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% de forma que para cada 1,00g de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja reagisse com pelo menos 200,00mg do metal foi estimada, conforme a tabela 4.

A tabela 5 mostra a variação de pH durante a reação de complexação, e como podemos visualizar durante a reação de complexação do hidrolisado enzimático parcial de proteína com os metais Ferro e Cobre há uma grande redução no pH no meio de reacional, o que sugere que o metal está se ligando aos peptídeos do hidrolisado. Porém, o mesmo não ocorre durante a reação com os metais Zinco e Manganês.

Tabela 5 – Variação do pH durante a reação de complexação

Metal	pH inicial	pH final
Cu	7,55	4,21
Fe	7,69	5,41
Mn	7,94	7,51
Zn	8,67	6,47

Durante a reação de complexação do hidrolisado com os metais Ferro e Cobre, na forma de seus respectivos cloretos, a redução do pH para valores abaixo de 5 ocorre a precipitação do complexo, porém em pH abaixo de 2 ocorre a re-dissolução do precipitado. Esta condição é importante, pois facilita a separação do complexo do meio reacional. O mesmo não ocorre com os metais Zinco e Manganês, independentemente do pH. Após a reação de complexação o meio reacional foi centrifugado, o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi lavado com 1,0mL HCl 0,001M, para retirar metais não complexados. Esta operação foi repetida por duas vezes. Após a lavagem, o precipitado foi liofilizado e a massa final recuperada para os diferentes complexos, a qual está relacionada na tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento da reação de complexação.

COMPLEXOS	Hidrolisado Proteína de Soja (mg)	Metal (mg)	Sal do Metal (mg)	Complexo (mg)	Massa recuperada
Hidrolisado-Cu	2.000	317,73	852,4	1.070,0	37,51%
Hidrolisado-Fe	2.000	279,23	1.351,6	1.649,0	49,20%
Hidrolisado-Mn	2.000	494,44	1.731,6	161	4,31%
Hidrolisado-Zn	2.000	326,95	681,4	126	4,70%

O rendimento de todos os complexos pode ser considerado baixo, no caso dos complexos de Ferro e Cobre isto pode ser atribuído ao deslocamento do metal devido à lavagem com a solução de ácido clorídrico 0,001M, ou seja, esta solução foi suficientemente forte para desfazer o complexo. No caso dos metais Zinco e Manganês podem ser atribuídos a não precipitação do complexo formado, ficando todo no sobrenadante.

Assim, a formação dos complexos foi avaliada de forma semi-quantitativa, por voltametria cíclica com os complexos de Manganês e Zinco, que indicam a presença de metal livre em solução e desta forma determinar a relação estequiométrica ideal para a formação dos complexos de minerais.

Para auxílio do estabelecimento da relação estequiométrica ideal para os complexos com o mineral Ferro foi feita a detecção de metal livre (Fe^{+3}) utilizando a reação com tiocianato de potássio.

Uma forma de investigar a ligação metal-ligante (proteína) é através da determinação do comportamento redox do metal, ou seja, os potenciais redox são diferentes quando o íon metálico está coordenado ou não ao ligante. Para isso realizaram-se experimentos de voltametria cíclica em soluções contendo metal e proteína com diferentes proporções incluindo os extremos. Com isso,

pode-se avaliar semi-quantitativamente a proporção estequiométrica metal-proteína.

Para a realização do ensaio de voltametria cíclica nos complexos de Manganês e Zinco foram coletadas alíquotas de complexo de modo a obter uma concentração de 0,1mM em KCl 0,1M.

A voltametria cíclica foi realizada com a intenção de verificar a presença de metal livre em solução através de seus picos de redução e/ou oxidação, desta forma, por comparação, poder-se-ia inferir a presença de metal em excesso mo meio de reação.

Tabela 7 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $MnCl_2$ 0,5M para o ensaio de voltametria cíclica.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado/Metal (v/v)	Volume de $MnCl_2$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Mn (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)	Indicação de Metal livre por Voltametria
1	2:1	10,0	274,7	20	+
2	2,66:1	7,5	206,03	20	+
3	3:1	6,5	178,56	20	+
4	3,33:1	6,0	164,82	20	-
5	3,64:1	5,5	151,06	20	-
6	4:1	5,0	137,35	20	-

As tabelas 7 e 8 indicam, respectivamente, as relações entre Hidrolisado e sais de metais de Manganês e Zinco para a obtenção de complexo Peptídeo-mineral, que posteriormente foram analisadas por voltametria cíclica. Na tabela 7 podemos observar que a partir da relação 3,33:1 Hidrolisado/Solução de metal Mn ocorre ausência da indicação de presença de metal Mn livre em solução, que será explicado mais detalhadamente e demonstrado nas figuras a seguir; podemos dizer que o mesmo acontece com o metal Zinco, quando a relação do complexo chega a 4:1 das soluções de Hidrolisado/Metal Zn.

Tabela 8 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $ZnCl_2$ 0,5M para o ensaio de voltametria cíclica.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado/Metal (v/v)	Volume de $ZnCl_2$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Zn (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)	Indicação de Metal livre por Voltametria
1	2:1	10,0	326,95	20	+
2	2,66:1	7,5	245,21	20	+
3	3,33:1	6,0	196,17	20	+
4	3,64:1	5,5	179,82	20	+
5	4:1	5,0	163,48	20	-

Inicialmente foi feito um voltamograma do hidrolisado para verificar seu comportamento em solução, ou seja, se em sua composição havia íons livres, e também para comparar com o hidrolisado complexado aos metais Manganês e Zinco. A figura 14 apresenta o perfil potenciodinâmico do Hidrolisado em solução aquosa na ausência de íons metálicos.

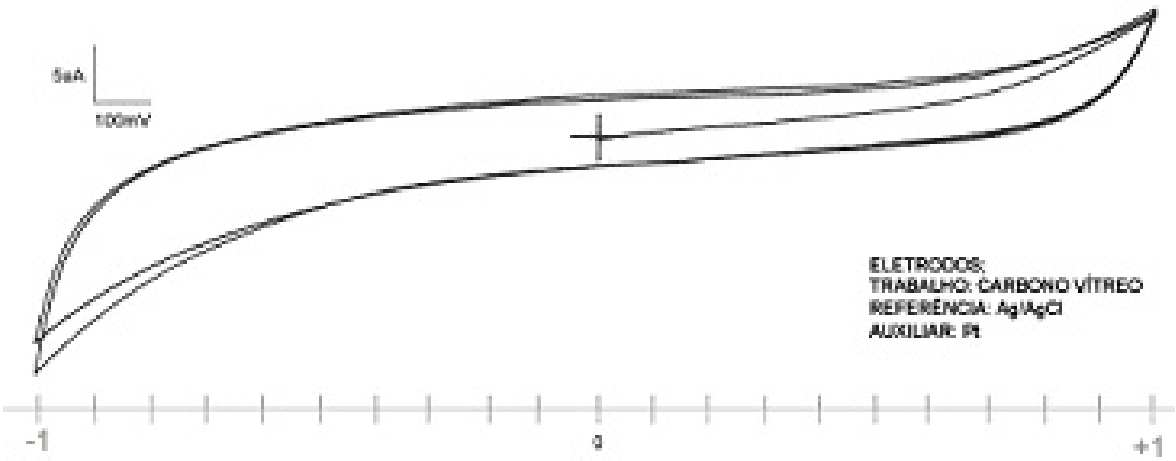

Figura 14 - Voltamograma do Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja

A figura 15 representa o comportamento do metal Manganês em solução. A partir dela, podemos inferir que o metal Manganês em solução forma

filme na superfície do eletrodo, além de picos de oxidação e redução, apresentando, desta forma, o comportamento característico do metal.

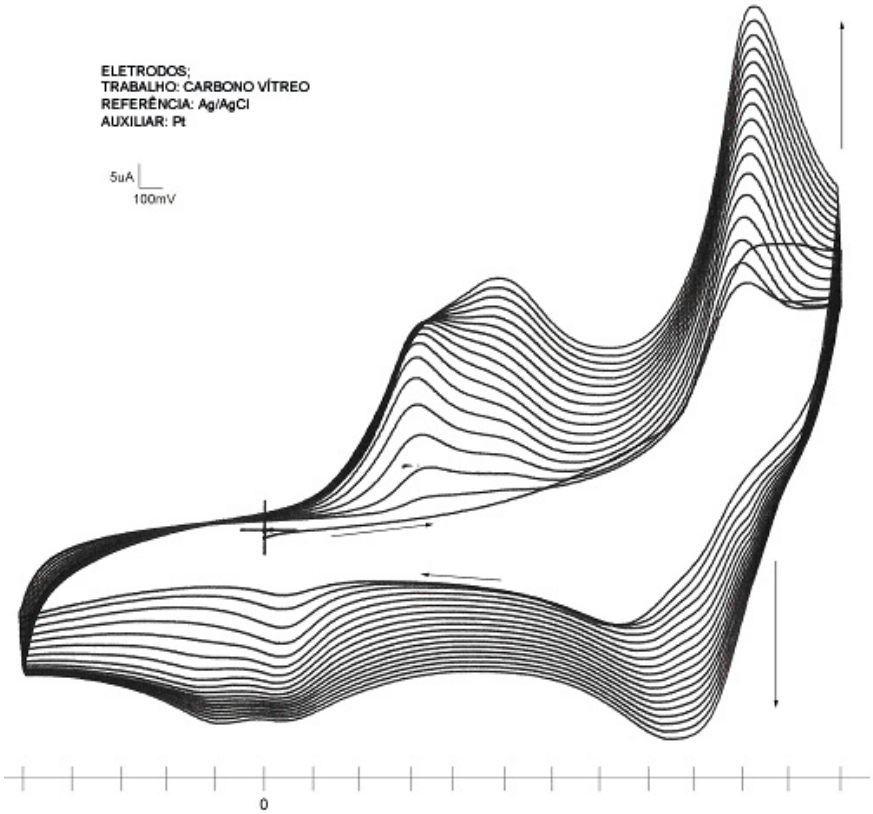

Figura 15 - Voltamograma da Solução de Cloreto de Manganês em KCl 0,1M

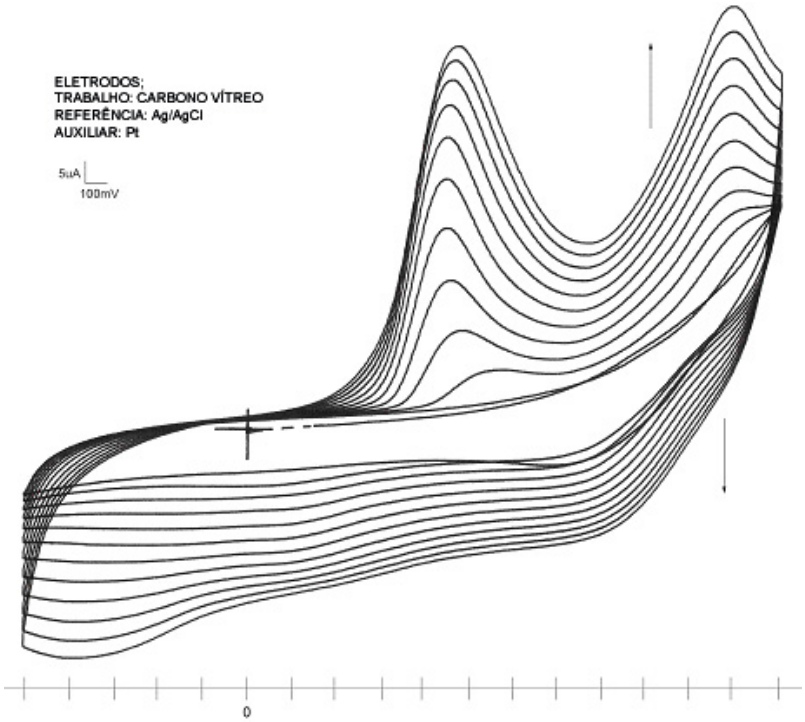

Figura 16 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 2:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M.

As figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21 representam os voltamogramas realizados a partir dos complexos de Hidrolisado de Proteína de Soja com o mineral Manganês em diferentes concentrações.

A seqüência dos voltamogramas das figuras (15, 16, 17 e 18) mostrou que o íon Mn^{2+} em solução, se oxida e deposita na superfície do eletrodo, provavelmente como óxido insolúvel. justificando-se assim o aumento dos picos redox com as varreduras consecutivas. Conforme o Mn^{2+} se coordena aos Hidrolisados Parciais de Proteína de Soja este processo é inibido, como se observa nas figuras subseqüentes (19, 20 e 21).

Através dos voltamogramas apresentados podemos sugerir que quando o metal Manganês está livre em solução (fig. 15) ele apresenta picos de

oxidação e redução, além da capacidade de formar filme sobe a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Desta forma, podemos analisar que quando foi adicionado 10mL da solução de Cloreto de Manganês ($MnCl_2$) 0,5M (ou seja, o correspondente a 274,7mg de metal Manganês) em 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% (fig. 16) para a formação do complexo houve um acentuado excesso de metal Manganês, sendo assim a quantidade de $MnCl_2$ foi diminuída pela metade (o correspondente a 137,35mg de metal Manganês) para a realização da reação de complexação (fig. 21), e conforme demonstra a figura, a ausência de picos de oxidação e redução e a não formação de filme sobre a superfície do eletrodo, sugerem que todo o conteúdo de metal Manganês que foi adicionado à solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% foi complexado, não restando metal livre em solução.

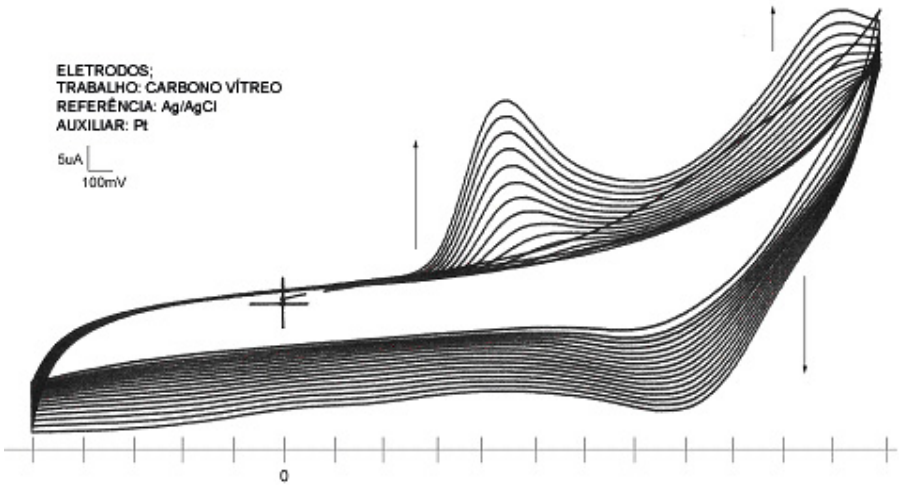

Figura 17 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 2,66:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M

Sendo assim, foi preparado um complexo intermediário, onde foi adicionado 7,5mL de Solução de $MnCl_2$ 0,5M (o qual corresponde a 206,25mg de metal Manganês) em 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% (fig.

17) onde foi constada à presença de picos de oxidação e redução e a formação de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. A fim de estabelecer a relação ideal entre Solução de $MnCl_2$ 0,5M e a Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% foi preparada um novo complexo onde foi adicionado 6,5mL de Solução de $MnCl_2$ 0,5M (o correspondente a 178,56mg de metal Manganês) e 20mL de Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, o qual apresentou segundo o voltamograma da fig. 18 que houve, embora de forma e intensidade mais sutis, a formação de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e a constatação da presença de picos de oxidação e redução do metal Manganês.

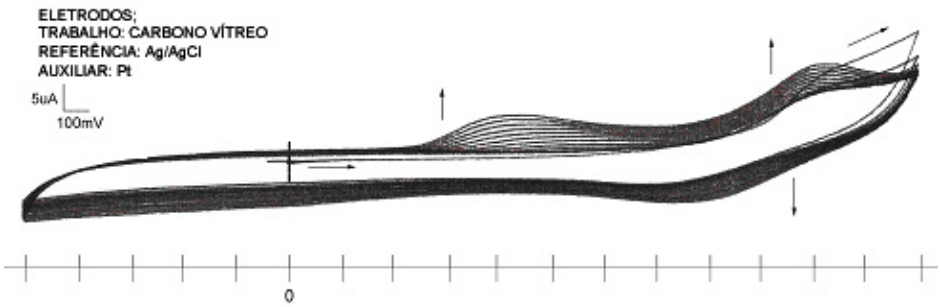

Figura 18 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M

Novamente a quantidade de Solução de $MnCl_2$ 0,5M foi diminuída, desta vez para 6,0mL (o que corresponde a 164,82mg de metal Manganês), para a reação de complexação com 20mL de Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, o resultado ilustrado pela fig. 19 indica que todo o Manganês adicionado para a reação de complexação foi ligado ao Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, pela ausência de picos de oxidação e redução característicos do metal Manganês e pela ausência de formação de filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo.

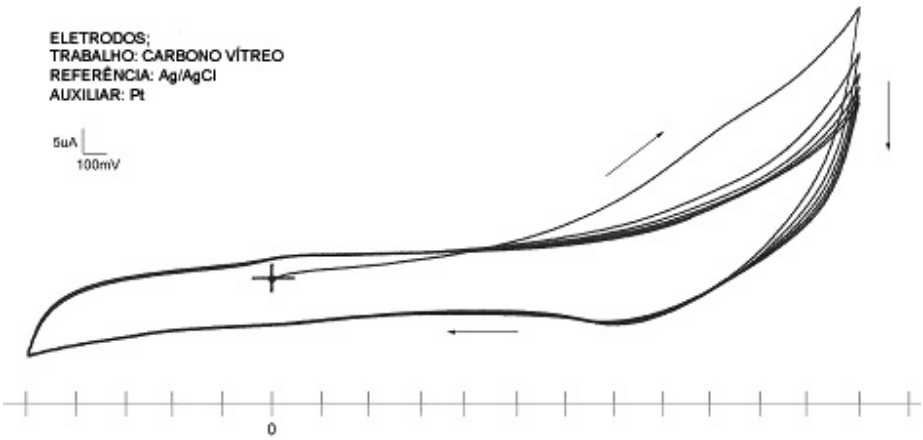

Figura 19 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3,33:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M

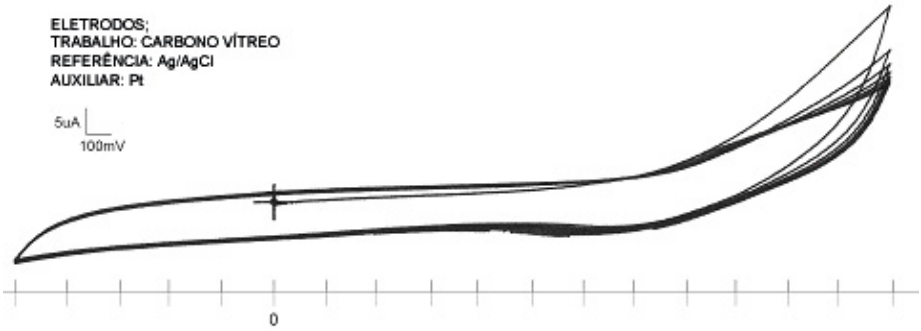

Figura 20 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 3,64:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M

Para a confirmação de que a quantidade de 6,0mL de Solução de $MnCl_2$ 0,5M havia sido suficiente e ideal para as reações de complexação de Hidrolisado parcial de Proteína de Soja sem que houvesse excesso do metal Manganês foi realizada uma outra reação de complexação agora com 5,5mL de Solução de $MnCl_2$ 0,5M (onde devem conter 151,09mg de metal Manganês) para 20mL de Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, onde o voltamograma (fig. 20) indica a não formação de filme na superfície do eletrodo e não mostra a existência de picos de oxidação e redução do metal Manganês, nos

fornecendo informações que sugerem a ausência do metal Manganês livre em solução.

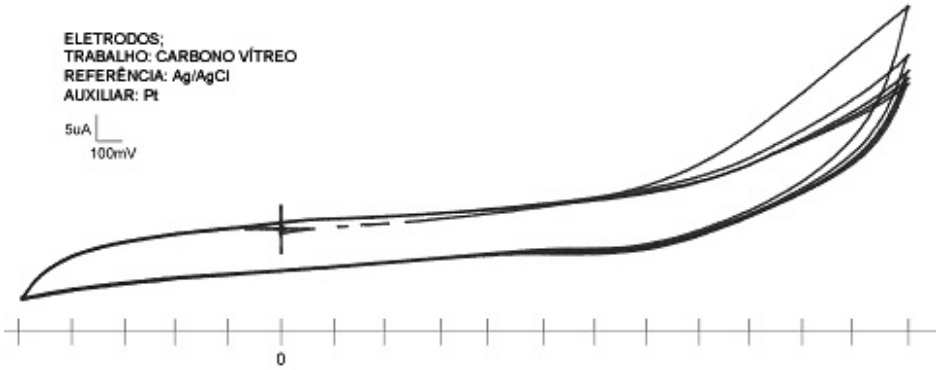

Figura 21 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Manganês na relação 4:1 Hidrolisado 10%/$MnCl_2$ 0,5M

Podemos finalizar esta análise sugerindo que a melhor relação entre Solução de $MnCl_2$ 0,5M e a de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% é 6,0mL de Solução de $MnCl_2$ 0,5M para 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, indicação esta que será definitivamente comprovada após a quantificação do Manganês por espectroscopia de absorção atômica. Portanto, a quantidade estimada de metal Mn ligado no complexo Peptídeo-Mn foi de 8,241%.

O mesmo procedimento foi utilizado para a determinação do ponto final da reação de complexação do Hidrolisado com o metal Zinco.

A fig. 22 mostra o comportamento do metal Zinco em solução, o qual se apresenta com um pico característico de redução. Desta forma, podemos inferir que os voltamogramas dos complexos de Zinco obtidos que apresentam picos de redução, possuindo em sua composição íons de metais Zinco em solução.

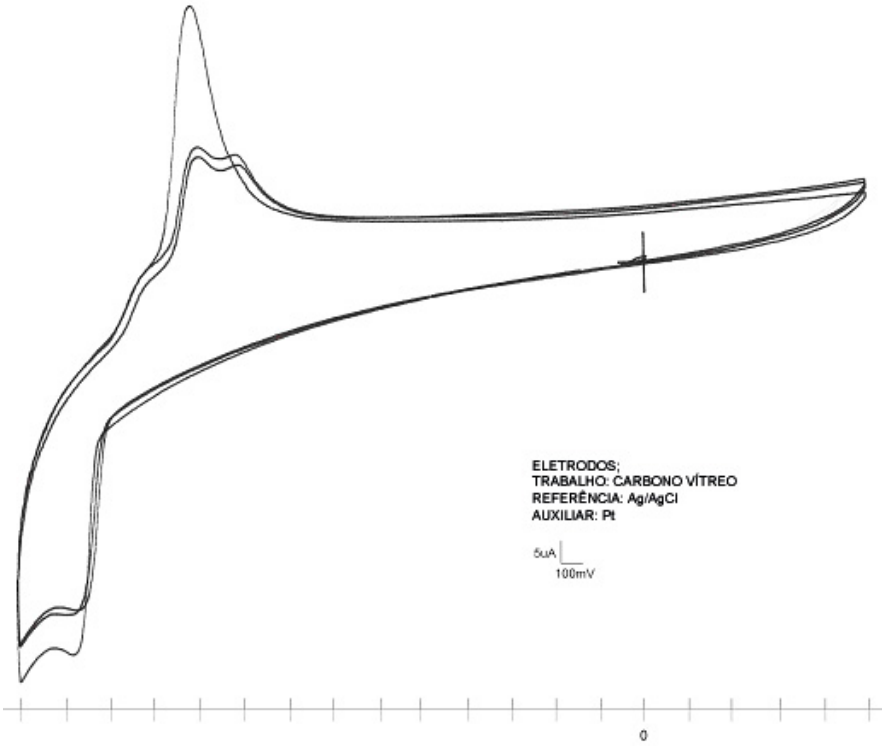

Figura 22 - Voltamograma da Solução de Cloreto de Zinco em KCl 0,1M

Os voltamogramas realizados a partir dos complexos de Hidrolisado de Proteína de Soja com o mineral Zinco em diferentes concentrações estão ilustrados abaixo através das figuras 23, 24, 25, 26 e 27.

Através dos voltamogramas apresentados podemos sugerir que quando o metal Zinco está livre em solução (fig. 22) ele apresenta um pico característico de redução. Desta forma, podemos analisar que quando foi adicionado 10mL da solução de Cloreto de Zinco ($ZnCl_2$) 0,5M (ou seja, o correspondente a 3.269,5mg de metal Zinco) em 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% (fig. 23) para a formação do complexo houve um acentuado excesso de metal Zinco.

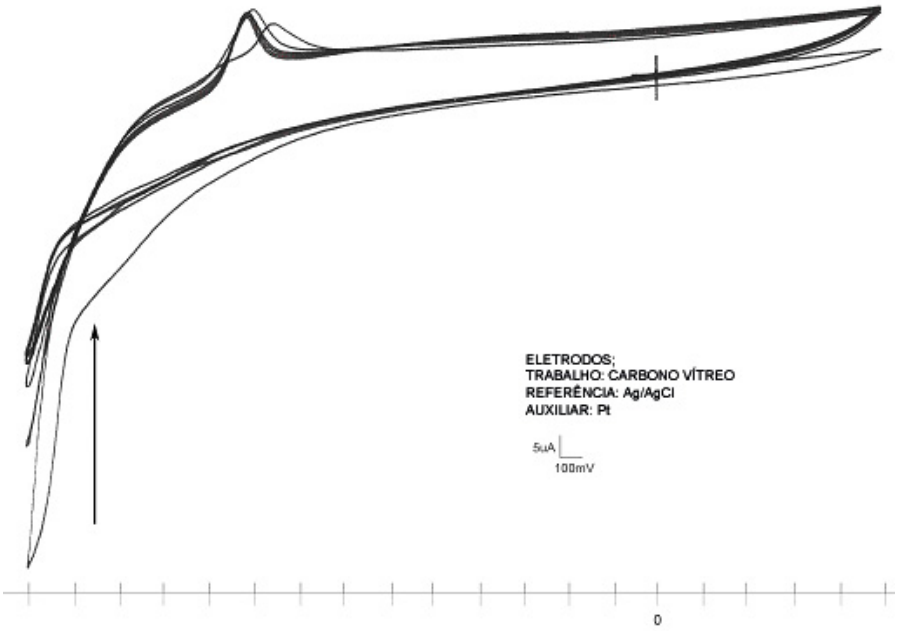

Figura 23 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 2:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M

Sendo assim a quantidade de $ZnCl_2$ foi diminuída pela metade (o correspondente a 1,634g de metal Zinco) para a realização da reação de complexação (fig. 27), e conforme demonstra a figura, a ausência do pico de redução sugere que todo o conteúdo de metal Zinco que foi adicionado à solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% foi complexado, não restando metal livre em solução.

A seguir, foi preparado um complexo intermediário, onde foi adicionado 7,5 mL de Solução de $ZnCl_2$ 0,5M (o qual corresponde a 1.634,75mg de metal Zinco) em 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% (fig. 24) onde foi constado a presença do pico característico de redução do metal Zinco.

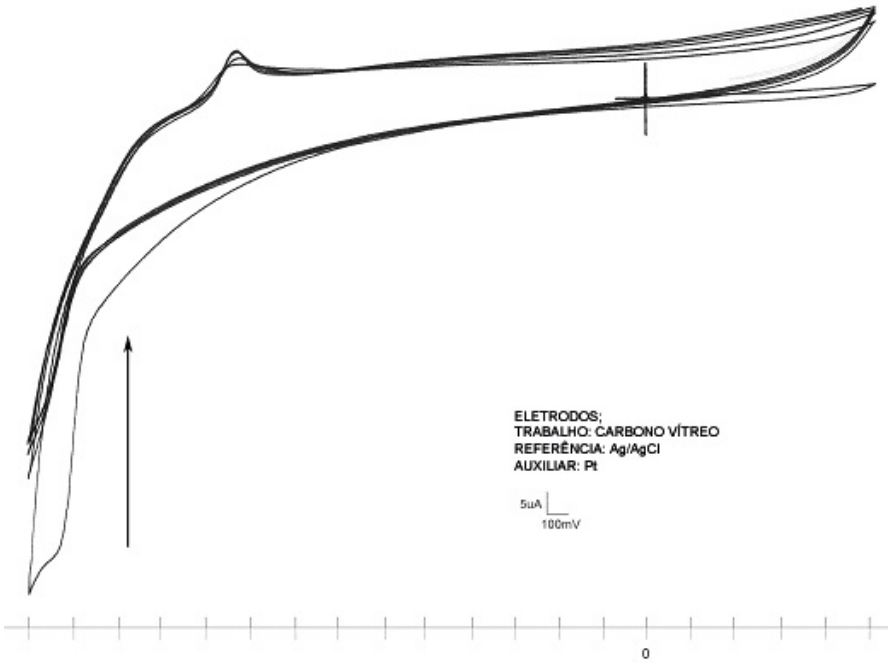

Figura 24 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 2,66:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M

A fim de estabelecer a relação ideal entre Solução de $ZnCl_2$ 0,5M e a Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, foram preparados outros complexos onde foram adicionados 6,0mL (equivalente a 2.452,13mg de metal Zinco) e 5,5mL (equivalente a 1.961,7mg de metal Zinco) de Solução de $ZnCl_2$ 0,5M, o correspondente a respectivamente: e de metal Zinco em 20mL de Solução de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, que são representados pelos voltamogramas das figuras 25 e 26, onde ambos apresentaram a formação do pico característico de redução do metal Zinco.

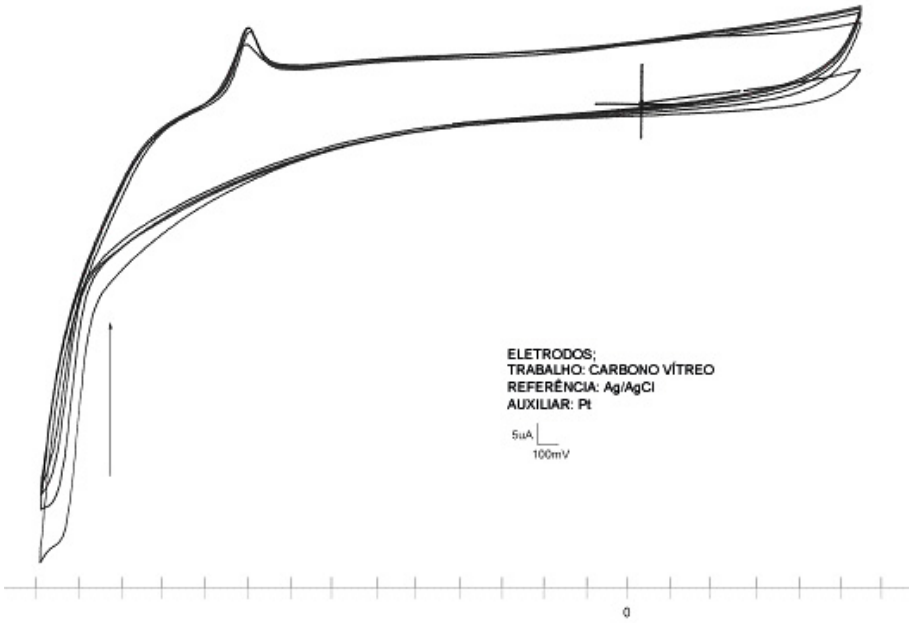

Figura 25 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 3,33:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M

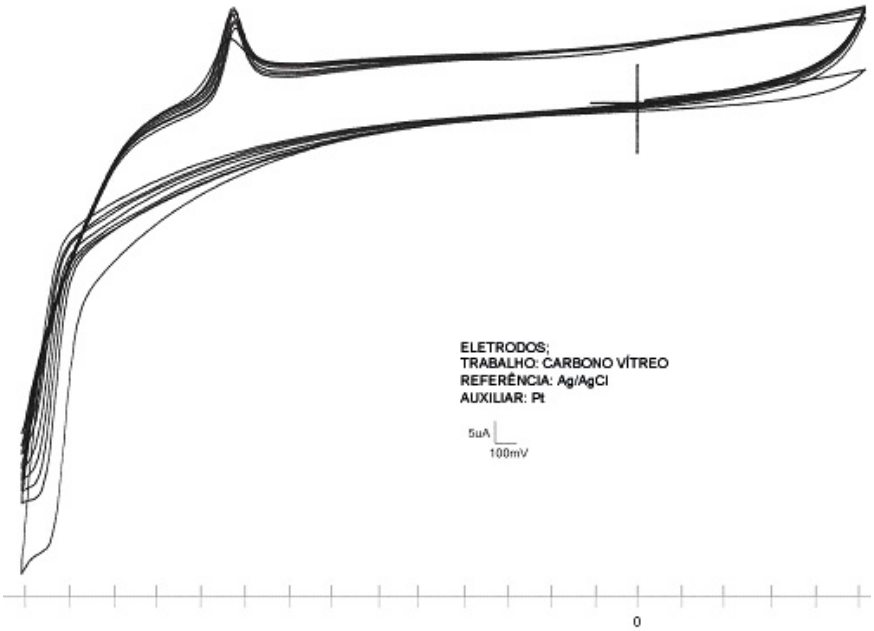

Figura 26 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 3,64:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M

A seqüência dos voltamogramas das figuras (23, 24, 25 e 26) mostrou que o íon Zn^{2+} em solução, se reduz na superfície do eletrodo, provavelmente formando um óxido insolúvel. Conforme o Zn^{2+} se coordena aos Hidrolisados parciais de proteína de soja este processo é inibido, como se observa na figura 27.

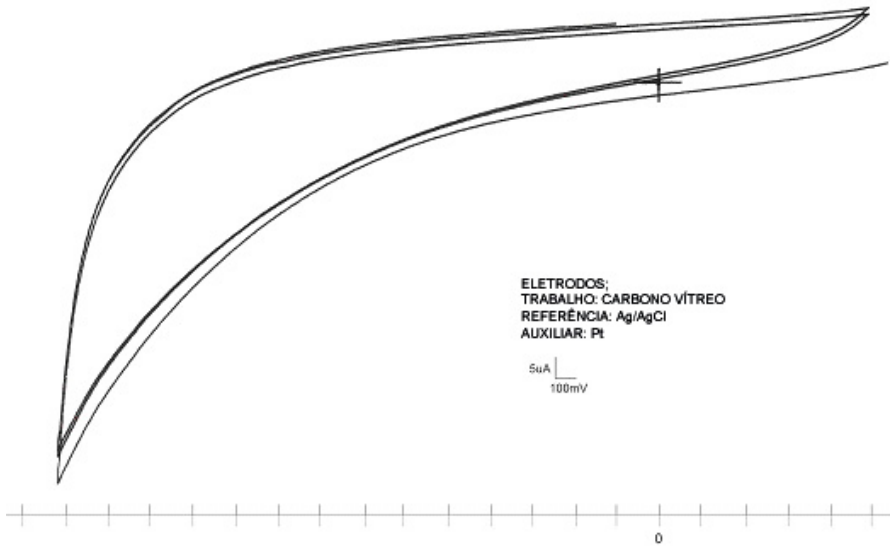

Figura 27 - Voltamograma do Complexo de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja com Zinco na relação 4:1 Hidrolisado 10%/$ZnCl_2$ 0,5M

Sendo assim, podemos finalizar esta análise sugerindo que a melhor relação entre Solução de $ZnCl_2$ 0,5M e a de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10% é 5,0mL de Solução de $ZnCl_2$ 0,5M para 20mL de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja 10%, portanto a estimativa de metal ligado no complexo Hidrolisado:Zinco foi de 8,174%.

A preparação dos complexos de Peptídeo-Ferro e o estabelecimento do ponto final de sua reação foram realizados através da reação

colorimétrica com Tiocianato de Potássio, o qual reage com o metal livre Ferro (Fe^{3+}) formando um complexo colorido vermelho intenso, logo a detecção de Fe^{3+} livre em solução pode ser feito, visualmente, desta forma.

Conforme o ilustrado pela tabela 12, foram preparados os complexos nas seguintes proporções de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja:Solução de Cloreto Férrico ($FeCl_3$) 0,5M – 2:1; 4:1; 6:1; 7:1; 7,75:1 e 8:1. sendo que após o preparo destes complexos o conteúdo foi centrifugado numa velocidade de 3.000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi lavado com HCl 0,001N por duas vezes. Foi adicionado, tanto ao sobrenadante como nas lavagens do precipitado, 2 gotas de Tiocianato de Potássio 1,0M.

A formação de uma coloração vermelho intensa somente foi observada nos seguintes complexos: 1, 2, 3 e 4 (que correspondem respectivamente às proporções Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja:Solução de Cloreto Férrico ($FeCl_3$) 0,5M de 2:1; 4:1; 6:1; 7:1), conforme podemos visualizar na tabela 9.

Tabela 9 – Relação entre os volumes de Hidrolisado obtido por Hidrólise Enzimática com Aranzime e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado/ Metal (v/v)	Volume de $FeCl_3$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Fe (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)	Reação com Tiocianato de Potássio
1	2:1	10,0	279,7	20	+
2	4:1	5,0	139,85	20	+
3	6:1	3,33	93,14	20	+
4	7:1	2,85	79,71	20	+
5	7,75:1	2,58	72,16	20	-
6	8:1	2,50	69,93	20	-

A estimativa de ligação Hidrolisado:Ferro nas seguintes proporções 2:1; 4:1; 6:1; 7:1; 7,75:1 e 8:1 foram de respectivamente 14,89%; 6,99%; 4,66%; 3,99%; 3,61% e 3,50%, sendo que até a relação 7:1 a reação com o tiocianato foi positiva, sugerindo Ferro em excesso.

Os complexos produzidos a partir de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtidos por hidrólise enzimática utilizando Neutrase e Alcalase foram preparados da mesma forma que os obtidos com Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja utilizando a enzima Aranzime, sendo que foi realizado o mesmo tratamento na produção do complexo para a definição da quantidade suficiente de Hidrolisado e metal Ferro para que não haja metal Ferro em excesso.

A tabela 10 ilustra a relação de Hidrolisado por Neutrase:Ferro, onde podemos observar que a reação com tiocianato de potássio é negativa a partir do complexo formado onde a proporção Hidrolisado por Neutrase:Ferro é de 1:0,115, o que nos sugere a ausência de metal Ferro em solução.

Tabela 10 – Relação entre os volumes de Hidrolisado por Hidrólise Enzimática com Neutrase e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado /Metal (v/v)	Volume de $FeCl_3$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Fe (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)	Reação com Tiocianato de Potássio
1	1:0,200	4	119,08	20	+
2	1:0,150	3	89,31	20	+
3	1:0,125	2,5	74,43	20	+
4	1:0,115	2,3	68,47	20	-
5	1:0,100	2	59,54	20	-

As estimativas de metal ligado nos complexos de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtidos por hidrólise com a enzima Neutrase com o metal Ferro nas proporções 1:,200; 1:0,150; 1:0,125; 1:0,115 e 1:0,100 são respectivamente 5,95%; 4,47%; 3,72%; 3,42% e 2,98%.

A tabela 11 representa a relação de Hidrolisado obtido por Hidrólise Enzimática utilizando a enzima Alacalase:Ferro, onde podemos observar que a reação com tiocianato de potássio é negativa a partir do complexo formado onde a proporção Hidrolisado por Neutrase:Ferro é de 1:0,080, o que nos permite inferir que a partir desta proporção não temos o metal Ferro livre em solução.

Tabela 11 – Relação entre os volumes de Hidrolisado obtido por Hidrólise Enzimática com Alcalase e $FeCl_3$ 0,5M para a reação com Tiocianato do Potássio.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado /Metal (v/v)	Volume de $FeCl_3$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Fe (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)	Reação com Tiocianato de Potássio
1	1:0,200	4	119,08	20	+
2	1:0,100	2	59,54	20	+
3	1:0,085	1,7	50,61	20	+
4	1:0,080	1,6	47,63	20	-
5	1:0,075	1,5	44,66	20	-
6	1:0,050	1	29,77	20	-

As estimativas de metal ligado nos complexos de Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtidos por hidrólise com a enzima Alcalase com o metal Ferro nas proporções 1:,200; 1:0,100; 1:0,085; 1:0,080 e 1:0,050 são respectivamente 5,95%; 2,98%; 2,53%; 2,38%; 2,23% e 1,49%.

A preparação dos complexos de Peptídeo-Cobre e o estabelecimento de sua relação estequiométrica foram feitos através da presença de Cobre livre (Cu^{2+}) em solução após a passagem do complexo por uma coluna de troca iônica com resina catiônica a fim de separar o conteúdo carregado positivamente (Cu^{2+}) do conteúdo neutro (Complexo Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja-Cobre).

Foi preparada uma coluna com resina catiônica, o conteúdo do complexo foi colocado na coluna, que reteve parte do conteúdo adicionado, o qual

estava carregado positivamente, ou seja, a parte do conteúdo do complexo que estava carregada com carga positiva ficou aderida à resina catiônica, sendo que o conteúdo sem carga (neutro) saiu após a lavagem com água destilada, para a recuperação do restante que estava carregado positivamente, a coluna foi lavada com HCl 1M, a fim de que as espécies carregadas fossem removidas com o auxílio do ácido.

A tabela 12 apresenta as relações de massa estabelecidas entre o Hidrolisado parcial de proteína de soja e o mineral Cobre para a verificação da relação estequiométrica da reação de complexação e posterior formação dos complexos Peptídeo-Cobre.

Tabela 12 – Relação entre os volumes de Hidrolisado e $CuCl_2$ 0,5M para a reação de complexação e posterior passagem pela coluna de resina catiônica.

COMPLEXOS	Relação Hidrolisado/Metal	Volume de $CuCl_2$ 0,5M (mL)	Massa do Metal Cu (mg)	Volume de Hidrolisado (mL)
1	2:1	10,0	317,75	20
2	4:1	5,0	158,88	20
3	6:1	3,33	105,81	20
4	7:1	2,85	90,56	20
5	7,75:1	2,58	81,98	20
6	8:1	2,50	79,44	20
7	12:1	1,67	53,06	20

Os resultados da quantificação do material contendo o metal Cobre carregado positivamente indicaram que a relação 2:1 Hidrolisado/metal não apresentava Cobre livre carregado positivamente.

A estimativa de ligação Hidrolisado:Cobre nas seguintes proporções 2:1; 4:1; 6:1; 7:1; 7,75:1; 8:1 e 12:1 foram de respectivamente 15,89%; 7,94%; 5,29%; 4,53%; 4,10%; 3,97% e 2,65%.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO PEPTÍDEO-MINERAL

4.4.1. Quantificação do metal ligado aos Peptídeos

Um passo importante para a caracterização é a quantificação de metal presente no complexo de Hidrolisado parcial de proteína de soja com o respectivo metal.

O resultado da quantificação dos metais Cu, Fe, Mn e Zn complexados com Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtidos por enzima Aranzime estão representados na tabela 13, enquanto a quantificação do metal Fe complexado com os Hidrolisados Parciais de Proteína de Soja obtidos pelas enzimas Neutrase e Alcalase. Estão dispostos na tabela 14.

Tabela 13 – Quantificação de metal ligado aos complexos de Cu, Fe, Mn e Zn com Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja obtido com Aranzime.

Metal	Hidrolisado	Complexo-Cu	Complexo-Fe	Complexo-Mn	Complexo-Zn
Cu	------	2,21%	------	------	------
Fe	------	------	1,22%	------	------
Mn	------	------	------	12,38%	------
Zn	------	------	------	------	10,40%

Tabela 14 – Quantificação de metal Ferro (Fe) ligado aos complexos dos Hidrolisados Parciais de Proteína de Soja obtidos com as enzimas Neutrase e Alcalase.

Metal	Complexo Fe-Neutrase	Complexo Fe-Alcalase
Fe	5,03%	3,52%

Os produtos quelatos metal-aminoácido, dos metais Cu, Fe, Mn e Zn que se encontram atualmente disponíveis no mercado são: Cobre Lisina Quelato Albion®; Ferrochel®; Ferro Taste Free®; Manganês Arginina Quelato Albion®; Manganês Chelazome®; Zinco Arginina Quelato Albion®; Zinco Chelazome®; Zinco Histidina Quelato Albion®; e Zinco Aminoácido Taste Free®. A tabela 15 apresenta a quantidade de metal ligado nestes compostos, segundo informações do fabricante ALBION LARABORATORIES INC.

Tabela 15 – Porcentagem de metal ligado aos produtos comercializados pela ALBION LABORATORIES INC

Produto	% de Metal Ligado
Cobre Lisina Quelato Albion®	10.0
Ferrochel®	20.0
Ferro Taste Free®	19.0
Manganês Arginina Quelato Albion®	10.0
Manganês Chelazome®	16,0
Zinco Arginina Quelato Albion®	10,0
Zinco Chelazome®	20,0
Zinco Histidina Quelato Albion®	10,0
Zinco Aminoácido Taste Free®	10,0

4.4.2 Avaliação do sítio de ligação

O sítio de ligação do mineral ao Hidrolisado parcial de proteína foi avaliado por espectroscopia vibracional na região do infra-vermelho. O espectro de Hidrolisado protéico é complexo e depende da contribuição relativa de cada aminoácido no peptídeo, e portanto do método de hidrólise. Associado a isto a disponibilidade de dados espectrais de complexos de peptídeos com metais são escassos. Assim, optamos por realizar a comparação de nossos dados espectrais com espectros mais simples, ou seja de aminoácidos isolados, o glicinato de metal. Tomamos como base que os principais sítios potenciais de ligação do metal

a estes compostos são o oxigênio e o nitrogênio (FARIAS, 2002), portanto nossa análise se restringe às bandas correspondente as aminas e carboxilas.

A tabela 16 nos mostra as bandas referentes aos estiramentos: -NH_2, do grupamento amina; -COO^- assimétrico e -COO^- simétrico. Estas bandas foram selecionadas, pois fornecem dados altamente indicativos de coordenação dos metais ao Hidrolisado parcial de proteína.

Tabela 16 – Análise dos espectros de infravermelho do Hidrolisado Parcial de Proteína de Soja e dos Complexos formados a partir de Cu, Fe, Mn e Zn

Bandas	Hidrolisado	Complexo-Cu	Complexo-Fe	Complexo-Mn	Complexo-Zn
ν_{NH2}	3358 cm^{-1}	3389 cm^{-1}	3396 cm^{-1}	3389 cm^{-1}	3376 cm^{-1}
ν_{aCOO^-}	1594 cm^{-1}	1651 cm^{-1}	1653 cm^{-1}	1654 cm^{-1}	1651 cm^{-1}
ν_{sCOO^-}	1398 cm^{-1}	1405 cm^{-1}	1402 cm^{-1}	1416 cm^{-1}	1407 cm^{-1}

Os espectros mostraram bandas de forte absorção devido ao estiramento assimétrico do grupo carboxílico, deslocado significantemente para regiões de baixas freqüências, conforme o esperado para desprotonação e coordenação (PREDIERI, 2005), como podemos observar na figura 28.

Ainda podemos observar que ocorre um aumento da separação entre as bandas ν_{aCOO^-} e ν_{sCOO^-}, sugerindo ligação metal-oxigênio (Farias, 1999).

Comparando com o trabalho realizado por CHAUD (1993) a banda larga em 3358 cm^{-1} refere-se a ligações N-H, O-H e à água de hidratação presente no Hidrolisado, desta forma podemos observar o estreitamento desta banda nos complexos formados inferindo ligação N-Metal.

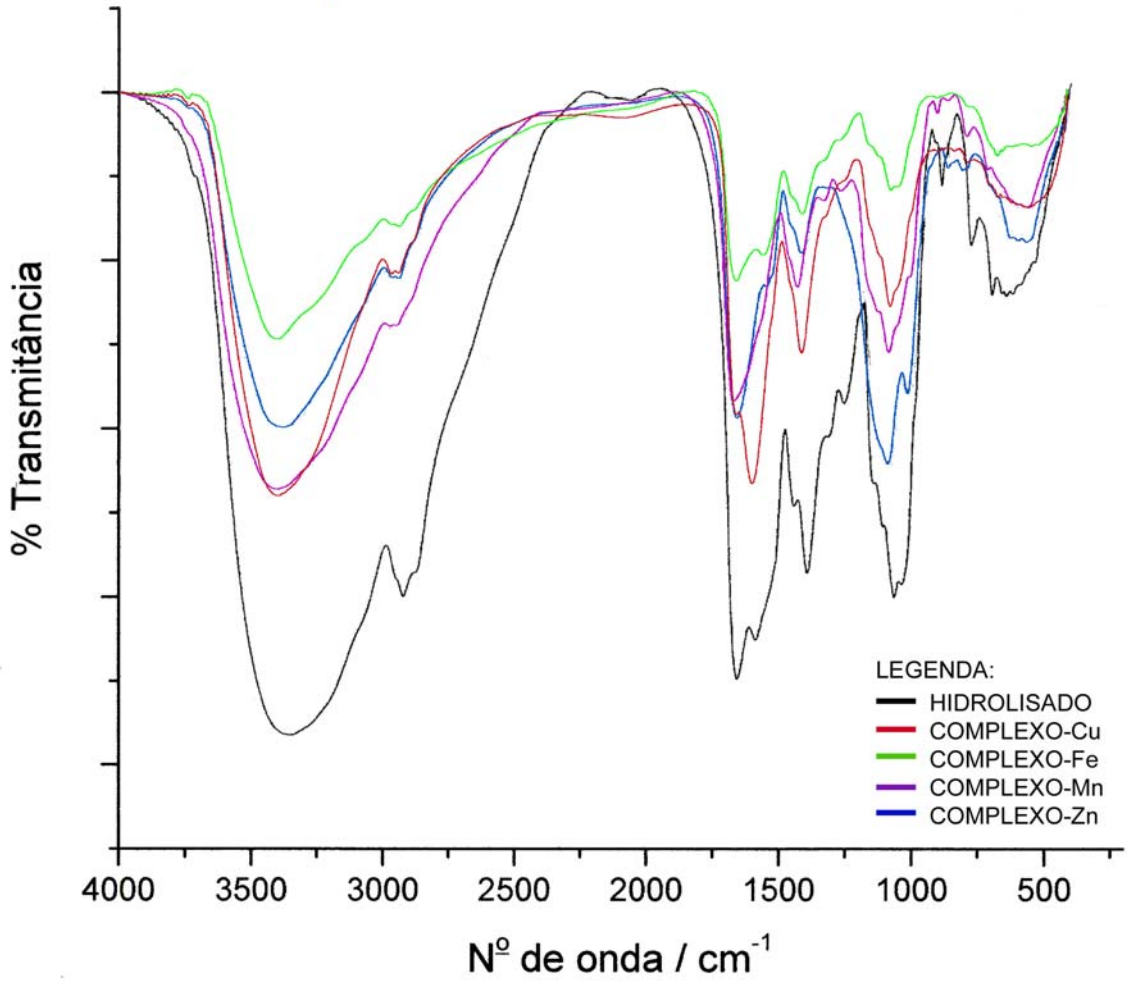

Figura 28 – Comparação dos espectros na região do infravermelho do Hidrolisado e dos complexos obtidos a partir de Cu, Fe, Mn e Zn.

Ao compararmos nossos dados com os obtidos por FARIAS (2002), podemos inferir que as bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupamento carboxílico do aminoácido glicina de 1412cm^{-1} e 1596cm^{-1} foram deslocadas para 1408cm^{-1} e 1655cm^{-1} nos complexos de glicina-Cobre e para 1409cm^{-1} e 1635cm^{-1} para os complexos de Manganês, sendo que em nosso trabalho as bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do Hidrolisado parcial de proteína de soja foram de 1398cm^{-1} e 1594cm^{-1} e se deslocaram para 1405cm^{-1} e 1651cm^{-1} no complexo Hidrolisado-Cobre; 1402cm^{-1}

e 1653cm^{-1} no complexo Hidrolisado-Ferro; 1416cm^{-1} e 1654cm^{-1} no complexo Hidrolisado-Manganês e 1407cm^{-1} e 1651cm^{-1} no complexo Hidrolisado-Zinco respectivamente, demonstrando a ocorrência de ligação do grupamento carboxílico aos metais em estudo; o que pode ser reforçado por CHAUD (1993), que ao realizar a análise para a mesma finalidade que em nosso trabalho, coloca em seu estudo que o estreitamento da banda referente a ligação N-H (nitrogênio-hidrogênio) e O-H (oxigênio-hidrogênio) está relacionado com as interações N-M (nitrogênio-metal) e O-M (oxigênio-metal).

Com base nas análises acima descritas podemos inferir que o principal sítio de ligação do material Hidrolisado parcial de proteína de soja com os metais Cu, Fe, Mn e Zn são as carboxilas, sendo que as ligações destes nos nitrogênios das aminas também ocorrem, porém em menor grau de prioridade do que nas carboxilas.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de utilização de hidrolisados enzimáticos parciais de proteína de soja, na obtenção de complexos com minerais, no entanto, é necessário aprimorar o processo de complexação, em especial para os metais ferro e cobre.

5. CONCLUSÃO

A hidrólise do isolado protéico de soja com Aranzime, proporcionou, hidrolisados com características mais adequadas. Porém esta enzima ainda não foi aprovada para uso alimentício.

Durante a reação, o complexo de ferro, com o hidrolisado enzimático parcial de proteína de soja precipita facilitando o processo, porém a quantidade de metal ligado não foi adequada.

Para os complexos solúveis (Zinco e Manganês) a voltametria cíclica demonstrou ser uma ferramenta adequada na determinação da estequiometria da reação.

Todos os metais utilizados se complexam preferencialmente às carboxilas e em menor extensão aos grupamentos amino.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AAFCO, Association of American Feed Control Officials, 2000.

ALBION LABORATORIES, INC. Minerals – Vital Components of your dietary intake. v. 2, n. 4. Clearfield, Utah. ALBION RESEARCH NOTES – A Compilation of Vital Research Updates on Human Nutrition. p. 1. 1993

ALLEN, L.H.; AHLUWALIA, N. Improving iron status through diet: the application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations. Arlington, VA: OMNI Project. John Snow, Inc., 1997.

ANDRADE, E. C. B.; BARROS, A. M.; TAKASE, I. Avaliação da solubilidade de cobre e zinco em caldos de leguminosas. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 23, n. 3, p. 386-388, 2003.

ASHMEAD, H. D., GRAFF, D. J. and ASHMEAD, H. H. Intestinal absorption of metal ions and chelates. Charles C. Thomas, Springfield, IL 1993 APUD in: LUO, X. G., HENRY, P. R., AMMERMAN, C. B.AND MADISON, J. B. Relative bioavailability of copper in a copper-lysine complex or copper sulfate for ruminants as affected by feeding regimen **Anim. Feed Sci. Technol**. v. 57, n. 4, p. 282, 1999.

ASHMEAD, H. D.; SAMFORD, R. A. Effects of metal amino acid chelates or inorganic minerals on three successive lactations in diary cows. Intern J Appl **Res Vet Med**, v. 2, n. 3, p. 181-188, 2004.

ASHMEAD, S.D. The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. **Arch Latinoam Nutr.** v.51, n. 1 Suppl 1, p. 7-12, 2001.

ATTEALMANNAN, M. A.; REID, R. S. The speciation of lysine-complexed copper as a bovine nutritional supplement. **J Inorg Biochem**, v.64, n.3, p.215-24, 1996

BARUSELLI, M. S. Suplementos e co-produtos na nutrição de gado de corte in I SIMBOI – Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, Brasília, 2005.

BIANCHI, M.L. Bioavailability of dietary iron. **Arch Latinoam Diet Iron,** v.42, n.2, p.94-100, 1992.

BLOEN, M.W. Interdependence of vitamin A and iron: association for programs of anemia control. **Proc Nutr Soc**, v.54, p.501-508, 1995.

BORGES, F. M. O.; SALGARELLO, R. M.; GURIAN, T. M. Recentes Avançoc na nutrição de cães e gatos in **III Simpósio sobre nutrição de animais de estimação**, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003.

BRODY, T. Nutritional Biochemistry, Ed. Academic Press, cap. 09, p.485-623, 1994.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clin Chem**, v. 49, n.10, p. 1573-8, 2003.

CAMAKARIS J.; VOSKOBOINIK I.; MERCER J.F.; Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.261, n.2,p.225-32, 1999

CANTANE, D. A.; FROLLINI, E. **Tipos de Voltametria**. Instituto de Química de São Carlos Universidade de São Paulo, São Carlos: 1998. p. 6 – 7.

CAO, J., HENRY, P. R., DAVIS, S. R., COUSINS, R. J., MILES, R. D., LITTELL, R. C. AND AMMERMAN, C. B. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations **Anim Feed Sci Technol**, v. 101, n. 25, p. 161-170, 2002.

CAULFIELD, L. E., BLACK, R. E. Zinc Deficiency in: Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. Geneva; World Health Organization; 2004, p. 257-279.

CHAUD M.V.; IZUMI C.; NAAL Z.; SHUHAMA T.; BIANCHI M.DE L.; FREITAS O.; Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **J Agric Food Chem** v.50, n.4, p.871-7, 2002.

CHAUD, M. V. **Quelato peptídeo-ferro: Uma alternative para aumentar a biodisponibilidade de ferro**. 1993. 87f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos: Química e Biologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1993.

CONNOR S.L.; GUSTAFSON J.R.; SEXTON G.; BECKER N.; ARTAUD-WILD S.; CONNOR W.E. The diet habit survery: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. **J Am Diet Assoc**, v.92, n.1, p.41-47, 1992.

CONTRERAS, F.; SIMONOVIS, N**.;** FOUILLIOUX, C.; BOLÍVAR, A.; CEVALLOS, J. L.; LEZAMA, E.; VELASCO, M. Zincuria and zincemia in postmenopausal osteoporosis. **International Congress Series**, v.1237, p.219-229, 2002

COOK, J.D.; CANIAGA, M.; KAHN, S.G. Gastric delivery system for iron supplementation. **Lancet**, v.335, n.8885, p.1136-1139, 1990.

CREMONESI, P.; STRADA, D.; GALIMBERTI, G.; SPOTOLLETTI, G. Iron derivates of modified milk protein. **Arzniem Forch. Drug Res**, v.34, n.9, p.948-952, 1984.

CRITCHFIELD, J. W.; CARL, F. G.; KEEN, C. L. Anticonvulsant-induced changes in tissue manganese, zinc, copper, and iron concentrations in Wistar rats. **Metabolism**, v.42, n.7, p.907-10, 1993

EVANS S.A.; OVERTON J.M.; ALSHINGITI A.; LEVENSON C.W. Regulation of metabolic rate and substrate utilization by zinc deficiency. **Metabolism**, v.53, n.6, p.727-32, 2004

FARIAS, R. F. Synthesis and characterization of manganese-glycine and copper-glycine adducts. Quim. Nova. v. 25, n. 5, p.729-730, 2002.

FRAZONE, J.S.; REBOANI, M.C.; MASON, V.; VILLANI, F. Synthesis of a new antianemic iron lysozyme glutarate complex and pharmaceutical studies in animals. **Arzneimittelforschung/Drug Research**, v.40, n.9, p.987-993, 1990.

FREIRE, W.B. Strategies of the Pan-American Health Organization/Worrl Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. **Nutr. Rev.**, v.55, n.6, p.183-188, 1997.

FREITAS, O.; PADOVAN, G.J.; VILELA, L.; DOS SANTOS, J.E.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E., GREENE, L.J. Characterization of protein hydrolisates prepared for enteral nutrition. **J Agric. Food Chem.**, n.41, p.1432-1438, 1993.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**.v. 102, n. 3, p. 783-8, 2003.

GARCIA-CASAL, M.N. LAYRISSE, M. The effect of change in pH on the solubility of iron bis-glycinate chelate and other iron compounds. **Arch Latinoam Nutr.** v. 51, n. 1 Suppl 1, p. 35-6, 2001.

GERBER, G. B.; LÉONARD, A.; HANTSON, PH. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n.1, p.25-34, 2002

GERLACH M.; BENSHACHAR D.; RIEDERER P.; YOUDIM M.B. Altered brain metabolism of iron as cause of neurodegenerative disease? **J Neurochem**, v.63, n.3, p.739-807, 1994.

GIBSON R.S. Zinc supplementation for infants. **Lancet**, v.355, n.9220, p.2008-9, 2000.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.38, n.2, p.232-42, 2003

GONG H.; AMEMIYA T. Optic nerve changes in manganese-deficient rats. **Exp Eye Res**, v.68, n.3, p.313-20, 1999.

GRANT E. C. Developmental dyslexia and zinc deficiency. **Lancet**, v.364, n.9430, p. 247-8, 2004.

GRAY M. Does oral zinc supplementation promote healing of chronic wounds? **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v.30, n.6, p.295-9, 2003.

HALLIWEL, B.; GUTERRIDGE J. M. C. Biological relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. **FEBS Lett**, v.307, p.108-112, 1992.

HAMADAMI J.D.; FUCHS G.J.; OSENDARP S.J.; HUDA S.N.; GRANTHAM-MCGREGOR S.M. Zinc supplementation during pregnancy and effects on mental

development and behaviour of infants: a follow-up study. **Lancet**, v.360,n.9329, p.290-4, 2002

HARRIS, Z. L.; KLOMP L.W.; GITLIN J.D. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. **Am J Clin Nutr**, v.67, p.972-7, 1998

HASSAN H.A.; NETCHVOLODOFF C.; RAUFMAN J.P. Zinc-induced copper deficiency in a coin swallower. **Am J Gastroenterol**, v.95, n.10, p.2975-7, 2000.

HEMKEN, R. W. Acesso a **http://www.animal.ufl.edu/dairy/Pubs/PDFs/copper.pdf** em 12 de abril de 2006.

HEMPE JM, COUSINS RJ.Effect of EDTA and zinc-methionine complex on zinc absorption by rat intestine **J Nutr**. 1989 Aug;119(8):1179-87.

HILL D.A., PEO E.R. JR, LEWIS A.J. Influence of picolinic acid on the uptake of zinc-amino acid complexes by the everted rat gut. **J Anim Sci.** v.65, n.1, p.173-8, 1987.

HOSTETLER, C. E.; KINCAID, R. L.; MIRANDO, M. A. The role of essential trace elements inembryonic and fetal development in livestock. **Vet J**, v.166, n.2, p.125-39, 2003.

HOUSE W.A., WELCH R.M. Bioavailability to rats of iron in six varieties of wheat grain intrinsically labeled with radioiron. **J Nutr** v.117, n. 3, p.476-80, 1987.

HOUSE, W. A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc **Field Crops Res.** V. 60, n. 1-2, p. 115-141, 1999.

HUNT J.R., JOHNSON P.E., SWAN P.B. Dietary conditions influencing relative zinc availability from foods to the rat and correlations with in vitro measurements. **J Nutr**.v. 117, n.11, p.1913-23, 1987.

INAG - INTERNATIONAL ANEMIA CONSULTIVE GROUP, **Erradication of Iron Deficiency Anemia**. Goteborg: INACG (nomeo), 1977.

KAPSOKEFALOU, M.; MILLER, D. D. Iron speciation in intestinal contents os rats fed meals compored of meat and nonmeat sources of protein and fat. **Food Chem** v. 52, p. 47-56, 1995.

KINCAID, R. L., BLAUWIEKEL, R. M. and CONRATH, J. D. Supplementation of copper as copper sulfate or copper proteinate for growing calves fed forages conteining molybdenum. **J Dairy Sci**, v. 69, p. 160-163, 1986 APUD in: LUO, X. G., HENRY, P. R., AMMERMAN, C. B.AND MADISON, J. B. Relative bioavailability of copper in a copper-lysine complex or copper sulfate for ruminants as affected by feeding regimen **Anim. Feed Sci. Technol**. v. 57, n. 4, p. 287, 1996.

KING, J. C., KEEN, C. L. 1994. In: Shils, M. E.; Olson, J. A.; Shike, M. (Eds.) Modern Nutrition in Health and Disease. Lea and Febirger, Philadelphia, P A pp.

214-230. APUD in: HOUSE, W. A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc **Field Crops Res.** V. 60, n. 1-2, p. 115-141, 1999.

KRATZER, F. H. and VOHRA, P. 1986. Chelates in nutrition. CRC Press, Boca Raton, FL.

KUO Y.M. et al. Mislocalisation of hephaestin a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the linked anaemia mouse. **Gut**, v.53, n.2, p.201-6, 2004.

LATHAM, M.C., ASH, D. NDOSSI, G. MEHANSHO, H. TATALA, S. Micronutrient dietary supplements--a new fourth approach. **Arch Latinoam Nutr.** v. 51, n. 1Suppl 1, p. 37-41, 2001.

LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C. LEETS, I.; TAYLOR, P. RAMIREZ, J. Effect of histidine, cysteine, glutatione and beef on iron absorption in humans. **J Nutr**, v.114, n.2, p. 217-223, 1984.

LEÓN, A.; GLENN J. S.; FARVER, T. B. Copper oxide wire particles for the treatment of copper deficiency in sheep. **Small Rumin Res**, v.35, p.7-12, 2000.

LI, S.F., LUO, X.G., LU, L., CRENSHAW, T.D., BU, Y.Q., LIU, B., KUANG, X., SHAO, G.Z. AND YU, S.X. Bioavailability of organic manganese sources in broilers fed high dietary calcium **Anim Feed Sci Technol**, In Press, Corrected Proof, Available online 6 June 2005.

LIEU P. T.; HEISKALA M.; PETERSON P. A.; YANG Y. The roles of iron in health and disease. **Mol Aspects Med**, v.22, p.1-87, 2001.

LINDER, M. C.; WOOTEN, L.; CERVEZA, P.; COTTON, S.; SHULZE, R.; LOMELI, N. Copper transport **Am. J. Clin. Nutr**, v.67 (Suppl.), p.965S–971S, 1998.

LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Effects of supplementation and food fortification on mineral bioavailability. **Rev Nutr**. V. 17, n. 1, p. 107-113, 2004

LUO, X. G., HENRY, P. R., AMMERMAN, C. B.AND MADISON, J. B. Relative bioavailability of copper in a copper-lysine complex or copper sulfate for ruminants as affected by feeding regimen **Anim. Feed Sci. Technol**. v. 57, n. 4, p. 281-289, 1996.

MALETTO, S. Absorção e interferência dos elementos minerais no organismo animal - micro elementos - Importância na sanidade. In: **Simpósio sobre Nutrição Mineral**. p.9-18, São Paulo, Anais. São Paulo: SNIDA, 1984 APUD in: BORGES, F. M. O.; SALGARELLO, R. M.; GURIAN, T. M. Recentes Avançoc na nutrição de cães e gatos in **III Simpósio sobre nutrição de animais de estimação**, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2003, p. 24.

MARCHETTI, M.; ASHMEAD, H. D.; TOSSANI. N.; MARCHETTI, S.; ASHMEAD, S. D. Comparison of the Rates of Vitamin Degradation when Mixed with Metal

Sulphates or Metal Amino Acid Chelates. **J Food Compost Anal**, v.13, n.6, p.875-884, 2000.

MCCORD J.M. Iron, free radicals and oxidative injury. **Semin Hematol**, v.35, p.5-12, 1998.

MERCK - Mineral deficiency and toxicity. Acesso a http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section1/chapter4/4e.jsp, em 10 de abril de 2006.

MERIALDI M.; CAULFIELD L.E.; ZAVALETA N.; FIGUEROA A.; DOMINICI F.; DIPIETRO J.A. Randomized controlled trial of prenatal zinc supplementation and the development of fetal heart rate. **Am J Obstet Gynecol**, v.190, n.4, p.1106-12, 2004.

MILES, R. D.; HENRY, P. R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 73-93, 2000.

MISHAAN, A. M. A.; ZAVALETA,N.; GRIFFIN, I. J.; HILMERS, D. C.; HAWTHORNE, K. M; ABRAMS, S. A. Bioavailability of iron and zinc from a multiple micronutrient-fortified beverage. **The Journal of Pediatrics**, v.145, n.1, p. 26-31, 2004.

NEAD, K.G.; HALTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; AUINGER, P.; WEITZMAN, M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. **Pediatrics**, v. 114, n. 1, p. 104-8, 2004.

OLIVARES, M.; UAUY, R. Copper as an essential nutrient. **Am J Clinical Nutrition**, v. 63, p.791S-796S, 1996.

OSENDARP S.J.; VAN RAAIJ J.M.; DARMSTADT G.L.; BAQUI A. H.; HAUTVAST J.G.; FUCHS G.J. Zinc supplementation during pregnancy and effects on growth and morbidity in low birthweight infants: a randomised placebo controlled trial. **Lancet**, v.357,n.9262, p.1080-5, 2001.

OSLON, P.A. BRINK, D.R. HICKOK, D.T. CARLSON, M.P. SCHNEIDER, N.R. DEUTSCHER, G.H. ADAMS, D.C. COLBURN, D.J. JOHNSON, A.B. Effects of supplementation of organic and inorganic combinations of copper, cobalt, manganese, and zinc above nutrient requirement levels on postpartum two-year-old cows. **J Anim Sci**. v.77, n.3, p. 522-532, 1999.

PABBRUWE M.B.; STANDARD O.C.; SORRELL C.C.; HOWLETT C.R. Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants. **Biomaterials**, v.25, n.20, p.4901-10, 2004.

PAGELLA, P.G.; BELLAVITE, O.; AGOZZINO, S.; DONA, G.C. Pharmacological and toxicological studies on an iron succinyl-protein complex (ITF282) for oral treatment of iron deficiency anemia. **Arzneimittelforschung**, v. 34, n.9, p. 952-958, 1984.

PEIXOTO, P. V.; MALAFAIA,P.; BARBOSA, J. D.; TOKARNIA, C. H. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. **Pesq Vet Bras**, v. 25, n. 3, p. 195-200, 2005.

POLÍTICA NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

PRASAD A. S.Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. Nutrition, v.17, n.7-8, p.685-7, 2001.

PREDIERI, G. ELVIRI, L. TEGONI, M. ZAGNONI, I. CINTI, E. BIAGI, G. FERRUZZA, S. LEONARDI, G. Metal chelates of 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in animal feeding. Part 2: Further characterizations, in vitro and in vivo investigations. **J Inorg Biochem.** v. 99, n.2, p.627-636, 2005.

REINHOLD D.; ANSORGE S.; GRUNGREIFF K. Immunobiology of zinc and zinc therapy. **Immunol Today**, v.20. n.2,p.102-3, 1999

REYNOLDS, J. E. S.(ed.) Martindale - **The extra pharmacopoeia** (CD-Rom), 31 ed. London Royal Pharmaceutical Society, 1997.

RICO H.; GOMEZ-RASO N.; REVILLA M.; HERNANDEZ E.R.; SECO C.; PAEZ E.; CRESPO E. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitomeric study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.90, n.1, p. 97-101, 2000.

RONZONI S.; GABER S.; VETTA F.; BRUNO A.; LUPATTELLI M.R.; DI MASSIMO M.; FABBRICONI P.; NOVI B.; BOLLEA M.R.; BIAGI A. Serum zinc levels in demented institutionalized patients. **Arch Gerontol Geriatr**, v.33, Suppl 1, p.341-6, 2001

SALGUEIRO M.J.; BOCCIO J. Zinc intake versus zinc absorption: a bioavailability factor. **Nutrition**, v.18, n.4, p.354, 2002 b.

SALGUEIRO M.J.; ZUBILLAGA M.B.; LYSIONEK A. E., CARO R.A. , WEILL R., BOCCIO J.R. The role of zinc in the growth and development of children. **Nutrition**, v.18, n.6, p.510-9, 2002 a.

SALGUEIRO, M.J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; SARABIA, M. I; CARO, R.; PAOLI, T.; HAGER, A.; WEILL, R.; BOCCIO, J.. Zinc as an essential micronutrient: A review. **Nutrition Research**, v.20, n.5, p.737-755, 2000.

SEN, A; KANANI, S.J. Deleterious functional impact of anemia on young adolescent school girls. **Indian Pediatr**., v. 43, n. 3, p. 219-26, 2006.

SMITH P. G. S.; YEOH G. C. T. Chronic iron overload induces oval cells in the liver. **Am J Pathol**, v.149, n.2, p.389-398,1996.

SMYTH, M., FITZGERALD, R. J. Characterization of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination **Int Dairy J** v.7, p. 571-577, 1997.

SOFIC E.; RIEDERER P.; HEINSEN H.; BECKMANN H.; REYNOLDS G.P.; HEBENSTREIT G.; YOUDIM M.B. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **J Nerural Transm**, v.74, n.3, p.199-205, 1998.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, n.1-2, p.151-163, 1996.

SPEARS, J. W., SCHLEGEL, P., SEAL, M. C.AND LLOYD, K. E. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions **Livest. Prod. Sci**. V. 90, n. 2-3, p. 211-217, 2004.

STEPHENSON, L.S. Possible new developments in community control of iron deficiency anemia. **Nutr Rev**, p.53, n.2, p.23-30, 1995.

STOLTZFUS R.J. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. **J. Nutr**., v.131, n.2, s.2, p.697-700, 2001.

STRAUSAK D.; MERCER J.F.; DIETER H.H.; STREMMEL W.; MULTHAUP G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. **Brain Res Bull**, v.55, n.2, p.175-85, 2001.

TAKEDA A. Manganese action in brain function. **Brain Res Brain Res Ver**, v41,n. 1, p.79-87, 2003.

TAPIERO, H. GATE, L. TEW, K.D. Iron: deficiencies and requirements. **Biomed Pharmacother.** v. 55, n. 6, p. 324-332, 2001.

TAYLOR, P. N.; PATTERSON, H. H.; WOLINSKY, I.; LIMIS-TAVANTZIS, D. J. Manganese deficiency affects HDL_1 and HDL_2 composition in rats . **Nutrition Research**, v.17, n.7, p.1155-1162, 1997.

THEIL E.C. Iron, Ferritin, and Nutrition. **Ann Rev Nutr**, v. 24, p.327-343, 2004.

TORREJON C.S.; CASTILLO-DURAN C.; HERTRAMPF E.D.; RUZ M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the Complementary National Food Program. **Nutrition**, v.20, n.2, p.177-80, 2004.

TORRENTE M.; COLOMINA M.T.; DOMINGO J.L. Effects of prenatal exposure to manganese on postnatal development and behavior in mice: influence of maternal restraint. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n.2, p. 219-25, 2002.

VEUM, T.L.; CARLSON, M.S.; WU, C.W.; BOLLINGER, D.W.; ELLERSIECK, M.R. Copper proteinate in weanling pig diets for enhancing growth performance and reducing fecal copper excretion compared with copper sulfate. **J Anim Sci**, v. 82, n. 4, p.1062-70, 2004.

VULPE C.D. et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. **Nat Genet**, v.21, n.2,p.195- 9, 1999.

WAPNIR, R.A. Copper absorption and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v. 67, n. 5 Suppl, p. 1054S-1060S, 1998.

WATZKE, H. J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. **Trends Food Sci Technol**, v.9, p.320-7, 1998.

WATZKE, H. J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, n. 8-9, p. 320-327, 1998.

WESSLING-RESNICK M. Biochemistry of iron uptake. **Crit Reb Biochem Molec Biol**, v.34, n.5, p.195-214,1999.

WHO – World Health Organization. Acesso a **http://www.who.int/nut/ida.htm** em 20 de janeiro de 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Role of zinc in human metabolic processes in Zinc in: Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Geneva; World Health Organization; 2005. p.230.

YANG, P.; KLIMIS-TAVANTZIS, D. J. Manganese deficiency alters arterial glycosaminoglycan structure in the Sprague-Dawley rat. **J Nutr Biochem**, v.9, n.6, p.324-331, 1998.

ZHANG, D. HENDRICKS, D. G. MAHONEY, A. W., YU, Y., THANNOUM, A. M. , SISSON, D. V. Bioavailability of total dietary iron from beef and soy protein isolate, alone or combined, in anemic and healthy rats. **Cereal Chem** v. 68, p. 194-200, 1991.