



**UNICAMP**

**MARIA ELISA CAETANO SILVA**

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE DE FERRO DE HIDROLISADOS  
PROTEICOS DE SORO DE LEITE OBTIDOS COM DIFERENTES ENZIMAS”**

**CAMPINAS**

**2013**



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MARIA ELISA CAETANO SILVA**

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE DE FERRO DE HIDROLISADOS  
PROTEICOS DE SORO DE LEITE OBTIDOS COM DIFERENTES ENZIMAS”**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Flavia Maria Netto

Co-orientadora: Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição na área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA  
MARIA ELISA CAETANO SILVA E ORIENTADA PELA  
PROF<sup>A</sup>. DRA. FLAVIA MARIA NETTO**

Assinatura da Orientadora

---

**CAMPINAS**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C116a Caetano-Silva, Maria Elisa  
Avaliação do potencial quelante de ferro de hidrolisados proteicos de soro de leite obtidos com diferentes enzimas / Maria Elisa Caetano Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Flavia Maria Netto.  
Coorientador: Maria Teresa Bertoldo Pacheco.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Peptídeos quelantes de ferro. 2. Quelatos. 3. Ferro. 4. Peptídeos do soro de leite. 5. Hidrolisados proteicos. I. Netto, Flavia Maria. II. Pacheco, Maria Teresa Bertoldo Pacheco. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of iron-binding potential from whey protein hydrolysates obtained with different enzymes

Palavras-chave em Inglês:

Iron-binding peptides

Chelates

Iron

Whey peptides

Protein hydrolysates

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Flavia Maria Netto [Orientador]

Lucia del Carmen de la Hoz Urrejola

Juliana Azevedo Lima Pallone

Data da defesa: 22-03-2013

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

## Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flavia Maria Netto  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone  
Membro Titular  
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

---

Dra. Lucia del Carmen de la Hoz Urrejola  
Membro Titular  
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos/ITAL

---

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud  
Membro Suplente  
Departamento de Ciências Farmacêuticas/UNISO

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Solange Cadore  
Membro Suplente  
Instituto de Química/UNICAMP

*“Para ser grande, sê inteiro  
Nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és no mínimo que fazes.  
Assim, em cada lago, a lua toda brilha,  
Porque alta vive”*

*Ricardo Reis  
(heterônimo de Fernando Pessoa)*

*Aos meus queridos pais, Sílvia e Luiz, por me ensinar e motivarem a ser o melhor que eu pudesse ser em cada coisa que eu fizesse!*

*A vocês, dedico este trabalho e a minha eterna gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado vinculada ao processo nº 2011/04948-3.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Flavia Maria Netto, pela presença, dedicação e atenção constantes na orientação do meu trabalho e pela enorme competência ao me mostrar o caminho na busca de respostas para os nossos problemas. Obrigada por me motivar a ser cada vez melhor, buscando o meu sucesso profissional, sempre!

À minha co-orientadora e incentivadora, Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, por confiar no meu trabalho e no meu potencial, me motivando a buscar cada vez mais, desde o início do nosso trabalho, há muitos anos. Obrigada pelo apoio, carinho e orientação de sempre!

Aos membros da Banca Examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone, Dra. Lucia del Carmen de la Hoz Urrejola, Prof. Dr. Marcus Vinícius Chaud, Prof<sup>a</sup>. Dra. Solange Cadore, pelas correções e sugestões valiosíssimas. Obrigada por colocarem a experiência de vocês a serviço, na busca da excelência do nosso projeto.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biotecnologia, CPNEM – ABTLus, Campinas/SP, especialmente à Dr<sup>a</sup> Adriana Franco Paes Leme e à Romênia Ramos Rodrigues, pelo suporte nas análises de espectrometria de massas e atenção em solucionar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Ponezi, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp; à Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Maria Alves Bueno, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, e a seus alunos, por cederem seus laboratórios e me auxiliarem na realização das análises de IMAC.

Aos meus pais, Sílvia e Luiz, pelo amor intenso e incondicional, demonstrado das mais diversas formas, e pelo exemplo que sempre foram pra mim, de coragem, gratidão, determinação e paixão e entrega por aquilo que se faz. Obrigada por cumprirem de forma tão brilhante o papel de pais, no sentido mais profundo dessa missão que lhes foi confiada!

Aos meus irmãos, Maria Clara e Luiz Fernando, que sempre foram mais do que irmãos, meus amigos, com quem eu sempre posso contar! Obrigada pelos momentos de risadas infinitas, pelas brigas, pelos abraços, pelos conselhos, pelo incentivo, pelo amor de irmãos mais velhos! Obrigada especial à minha engenheira preferida, Maria Clara, pelas inúmeras conversas, perguntas e questionamentos, que, com certeza, engrandeceram o meu trabalho!

Ao meu grande amor, namorado, amigo, companheiro, entusiasta, conselheiro, Bruno, por acreditar em mim e por sempre me empurrar pra frente, pra conquistar sempre mais, independente da dificuldade e esforço que isso exigisse! Obrigada por fazer os meus dias mais coloridos!

A todos aqueles da minha família que sempre me incentivaram, especialmente aos meus queridos padrinhos e madrinhas, minha vó Áurea e minha tia Vaide, pela torcida e amor de sempre!

Aos meus queridos revisores, Sílvia e Bruno, por aceitarem revisar meu trabalho com tanto carinho e paciência, mesmo sem entenderem quase nada daquelas palavras!

Às minhas queridas amigas do LBN, Fer, Jana, Mari, Elô, Tássia, Célia, Eliana e Beth, pela união e espírito de equipe do nosso laboratório, essenciais pra mim. A todas vocês e aos queridos Ju, Erick e Geina, agradeço pela amizade que construímos, por todos os momentos que dividimos, por todas as risadas, almoços, conversas, conselhos. Agradeço especialmente à Eliana, pelo apoio e ensinamentos com todo carinho, em toda e qualquer tarefa no laboratório; à Fer, pela tagarelice igual à minha, que tanto animou meus dias, e pelo sua generosidade em ajudar; à Mari, por ajudar a solucionar minhas dúvidas durante o projeto com tanto carinho e amizade; e à Jana, por ter sido uma amiga e companheira maravilhosa na árdua tarefa de fazer nascer uma dissertação!

Aos professores e funcionários do DEPAN, pela atenção e boa vontade em todos os momentos, me ajudando sempre no que fosse necessário. Especialmente ao Chico, pelo auxílio e paciência nas inúmeras análises no cromatógrafo.

À Universidade de Campinas e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Departamento de Alimentos e Nutrição, por possibilitarem a realização de um sonho, com todo o suporte necessário para a minha formação como Mestra.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), através de seus professores e funcionários, por ser parte essencial da descoberta do meu amor pela pesquisa durante minha formação como Cientista dos Alimentos. Obrigada especialmente às minhas queridas e eternas amigas da República Bombanulã, por serem presença constante na minha vida ainda hoje!

À turma do COTUCA, TA 03, pela amizade incomparável e por terem marcado de forma indelével o início da minha vivência no mundo dos alimentos!

À minha amiga e conselheira Simone, por todo o apoio e experiência, que sempre foram referência para mim!

A todos os meus amigos que tanto amo, especialmente Dé, Cá, Bruna, Mayla e Carol, que sempre me incentivaram e apoiaram, desde a decisão mais simples até às mais complexas. Obrigada por fazerem de mim uma pessoa melhor a cada dia!

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha trajetória e contribuíram para que eu chegasse até aqui. A todos vocês, muito obrigada! Que eu saiba retribuir tudo aquilo que vocês fizeram por mim!

E, acima de tudo, agradeço a Deus! Pela minha vida e por todas as vidas que fizeram a minha mais feliz; por ter permitido que as pessoas certas cruzassem o meu caminho no momento certo; por ter guiado cada passo meu para que eu chegasse aonde eu cheguei e por me dar a segurança de que eu posso chegar ainda mais longe.

## RESUMO

A deficiência de ferro é um dos principais problemas nutricionais no mundo, sendo a suplementação de alimentos com sais de ferro uma importante estratégia para combater essa deficiência. Porém, nessa forma, o mineral apresenta baixa biodisponibilidade e pode causar dor de estômago, diarreia, alterações de sabor e aparência dos produtos. Quelatos ferro-peptídeos têm sido apontados como uma promissora fonte de ferro mais biodisponível e com redução desses efeitos adversos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial de quelação de ferro dos peptídeos obtidos da hidrólise enzimática de isolado proteico de soro de leite (IPS) com as enzimas alcalase (HA), pancreatina (HP) ou flavourzyme (HF). Os hidrolisados foram ultrafiltrados (membrana de corte de 5 kDa) e as frações permeada (< 5 kDa) e retida (> 5 kDa) foram liofilizadas. Os hidrolisados e suas frações foram caracterizados quanto ao perfil aminoacídico, perfil de hidrofobicidade por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), perfil de massa molecular (MM) por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) e eletroforese SDS-PAGE Tricina. As frações foram avaliadas quanto à sua capacidade quelante de ferro, utilizando-se  $\text{FeCl}_2$  na proporção 40:1 proteína:Fe, pH 7,0,  $25 \pm 2$  °C/1h sob agitação, seguida de centrifugação. Para avaliação do ferro livre e/ou fracamente ligado aos peptídeos, o pH dos sobrenadantes da reação de quelação foi ajustado para 3,5 e o  $\text{Fe}^{2+}$  solúvel foi determinado. Foi selecionado o hidrolisado com maior capacidade quelante (frações HP > 5 kDa e HP < 5 kDa) para o prosseguimento do trabalho. Para avaliação da estabilidade do quelato, essas frações foram submetidas à digestão gástrica *in vitro* e posterior neutralização (pH 7,0), seguida de centrifugação. Os peptídeos das amostras selecionadas foram isolados por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC- $\text{Fe}^{3+}$ ). Os peptídeos com afinidade pelo ferro foram sequenciados por espectrometria de massas (MS/MS). O grau de hidrólise (GH) dos hidrolisados HA, HP e HF foi 16,8%, 16,4% e 9,1%, respectivamente. O perfil eletroforético das frações < 5 kDa não apresentou bandas, enquanto as frações > 5 kDa apresentaram bandas de MM inferior; porém, por CLAE-EM, foi verificado que todas as frações apresentaram peptídeos de MM aparente superior a 5 kDa, sugerindo que nas condições usadas houve formação de agregados. Na reação de quelação, HP > 5 kDa reteve 70,6% do ferro em solução, enquanto as demais frações variaram entre 37,4% e 66,1%. A fração HP > 5 kDa apresentou maior teor de ferro precipitado em pH 3,5 (65,3%), sugerindo maior interação peptídeos-ferro. A mesma amostra, após digestão gástrica, apresentou solubilidade do ferro inicialmente presente entre 57,8 e 59,0% em pH 7,0, sugerindo que a digestão com ou sem pepsina não desfez totalmente o complexo formado. Esse teor foi superior ao obtido com HP < 5 kDa (40,1 a 43,0%), bem como ao ensaio controle com  $\text{FeCl}_2$  (9,9%). No isolamento de peptídeos por IMAC- $\text{Fe}^{3+}$ , verificou-se maior teor de peptídeos com capacidade quelante de ferro na fração HP > 5 kDa (70%) do que na fração HP < 5 kDa (50%). O sequenciamento por MS/MS mostrou, em todos os fragmentos, presença de Glu e/ou Asp, cujos grupos carboxílicos estão entre os principais sítios de ligação com o ferro. Os resultados sugerem que a hidrólise do IPS com pancreatina origina peptídeos com alta capacidade quelante de ferro. Esses peptídeos podem ser usados para obtenção de quelatos  $\text{Fe}^{2+}$ -peptídeos que, futuramente, sejam aplicados para fortificação de alimentos no intuito de elevar a biodisponibilidade do ferro, além de potencialmente reduzir seus efeitos pró-oxidantes.

**Palavras-chave:** peptídeos quelantes de ferro; quelatos; ferro; peptídeos do soro de leite; hidrolisados proteicos.

## ABSTRACT

Iron deficiency is one of the major nutritional problems in the world, being the food supplementation with iron salts an important strategy to combat this deficiency. However, in salt form, this mineral has low bioavailability and may lead to stomachache, diarrhea and even cause changes in flavor and appearance of food products. Iron-peptides chelates have been suggested as a promising source of more bioavailable iron, reducing these side effects. This study aimed at evaluating the iron-binding ability of peptides obtained from enzymatic hydrolysis of whey protein isolate (WPI) with alcalase (AH), pancreatin (PH) or flavourzyme (FH). Hydrolysates were ultrafiltered in 5 kDa membrane and permeate (< 5 kDa) and retentate (> 5 kDa) fractions were lyophilized. Hydrolysates and their fractions were characterized by aminoacidic profile, hydrophilicity profile by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), molecular weight (MW) profile by size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and SDS-PAGE Tricine). Fractions were evaluated by iron-binding ability using  $\text{FeCl}_2$  (40:1 protein:Fe ratio) at pH 7.0 and  $25 \pm 2$  °C for 1h under stirring, followed by centrifugation. For evaluation of free and/or weakly bound iron, the pH of the supernatant from the chelation reaction was adjusted to 3.5 and soluble  $\text{Fe}^{2+}$  was determined. The hydrolysate with higher iron-binding ability was selected (fractions PH > 5 kDa and PH < 5 kDa) for further proceeds. To evaluate the chelate stability, these fractions were subjected to *in vitro* gastric digestion and further neutralization, followed by centrifugation. The peptides of selected samples were isolated by immobilized metal affinity chromatography (IMAC- $\text{Fe}^{3+}$ ). The peptides with iron-binding affinity were sequenced by mass spectrometry (MS/MS). The degree of hydrolysis (DH) of hydrolysates AH, PH and FH was 16.8%, 16.4% and 9.1%, respectively. Electrophoretic profile of fractions < 5 kDa did not present any band, while fractions > 5 kDa presented peptides with lower MW. However, by SE-HPLC, it was verified peptides with apparent MW above 5 kDa for all samples, suggesting that, under the conditions studied, there was aggregates formation. In the chelation reaction, PH > 5 kDa retained 70.6% of iron in solution, while other samples ranged from 37.4% to 66.1%. PH > 5kDa showed higher content of precipitated iron in pH 3.5 (65.3%), suggesting greater peptide-iron interaction. After gastric digestion, the same sample showed initial iron solubility ranging from 57.8 and 59.0% in pH 7.0, suggesting that digestion with or without pepsin was not able to completely break the complex formed. This content was higher than that obtained in both PH < 5 kDa (40.1 to 43.0%) and the control assay with  $\text{FeCl}_2$  (9.9%). IMAC- $\text{Fe}^{3+}$  isolation showed higher content of iron-binding peptides in PH > 5 kDa (70%) than in PH < 5 kDa (50%). The MS/MS sequencing showed Glu and/or Asp in all fragments, which carboxylic groups are among the main iron-binding sites. The results suggest that WPI hydrolysis with pancreatin yields peptides with high iron-binding ability. These peptides may be used for obtaining iron-peptide chelates, which, in future, may be applied in food fortification in order to increase iron bioavailability and potentially reduce its pro-oxidant effects.

**Keywords:** iron-binding peptides; chelates; iron; whey peptides; protein hydrolysate.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-La</b>	alfa-lactoalbumina
<b><math>\beta</math>-Lg</b>	beta-lactoglobulina
<b>BCA</b>	ácido bicinconínico
<b>BPI</b>	<i>Base Peak Intensity</i>
<b>BSA</b>	albumina de soro bovina
<b>CCP</b>	comprimento da cadeia peptídica
<b>CLAE-FR</b>	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
<b>DCCR</b>	delineamento composto central rotacional
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>E/S</b>	relação enzima/substrato (m/m)
<b>GH</b>	grau de hidrólise
<b>HA</b>	hidrolisado com alcalase
<b>HA &lt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular menor do que 5 kDa do hidrolisado com alcalase
<b>HA &gt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular maior do que 5 kDa do hidrolisado com alcalase
<b>HF</b>	hidrolisado com flavourzyme
<b>HF &lt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular menor do que 5 kDa do hidrolisado com flavourzyme
<b>HF &gt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular maior do que 5 kDa do hidrolisado com flavourzyme
<b>HP</b>	hidrolisado com pancreatina
<b>HP &lt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular menor do que 5 kDa do hidrolisado com pancreatina

<b>HP &gt; 5 kDa</b>	fração de massa molecular maior do que 5 kDa do hidrolisado com pancreatina
<b>HPq &lt; 5 kDa</b>	peptídeos com capacidade quelante de ferro da fração de massa molecular menor do que 5 kDa do hidrolisado com pancreatina
<b>HPq &gt; 5 kDa</b>	peptídeos com capacidade quelante de ferro da fração de massa molecular maior do que 5 kDa do hidrolisado com pancreatina
<b>IDA</b>	ácido imino diacético
<b>IMAC-Fe<sup>3+</sup></b>	cromatografia de afinidade por íons metálicos Fe <sup>3+</sup> imobilizados
<b>IPS</b>	isolado proteico de soro de leite
<b>MM</b>	massa molecular
<b>MS/MS</b>	espectrometria de massas tandem
<b>m/z</b>	relação massa/carga
<b>OPA</b>	oftaldialdeído
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>TR</b>	tempo de retenção

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da ligação entre um ligante e um metal.....	12
<b>Figura 2.</b> Representação diagramática de um adsorvente de IMAC (gel de IDA-Me) .....	19
<b>Figura 3.</b> Fluxograma de obtenção de quelato Fe <sup>2+</sup> -peptídeo.....	32
<b>Figura 4.</b> Eletroforese (SDS-PAGE em meio redutor) do isolado proteico de soro de leite (IPS).....	37
<b>Figura 5.</b> Curvas de hidrólise do isolado proteico de soro de leite (IPS) com as enzimas alcalase (pH = 8,0; E/S = 1%; 60 °C; 105 min), pancreatina (pH = 8,0; E/S = 4%; 40 °C; 180 min) e flavourzyme (pH = 6,7; E/S = 4%; 55 °C; 180 min).....	38
<b>Figura 6.</b> Eletroforese (SDS-PAGE/Tricina em meio redutor) dos hidrolisados e suas respectivas frações.....	44
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico (CLAE-FR) do isolado proteico de soro de leite (IPS) .....	46
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico (CLAE-FR) dos hidrolisados com alcalase, pancreatina e flavourzyme e suas respectivas frações .....	47
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos hidrolisados com alcalase, pancreatina e flavourzyme e suas respectivas frações .....	49
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico (IMAC-Fe <sup>3+</sup> ) das amostras HP > 5 kDa e HP < 5 kDa ...	55
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas (CLAE-FR acoplado a espectrometria de massas) das amostras HPq > 5 kDa e HPq < 5 kDa .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de aminoácidos totais das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados.....	40
<b>Tabela 2.</b> Composição de aminoácidos livres das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados.....	42
<b>Tabela 3.</b> Teor de grupos amino livres (meq NH <sub>2</sub> /g proteína), grau de hidrólise (GH), Σmeq aminoácidos livres/ g proteína, GH corrigido e comprimento médio da cadeia peptídica (CCP) das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados .....	43
<b>Tabela 4.</b> Teor de ferro no sobrenadante das amostras após reação de quelação em pH 7,0 e teor de ferro precipitado em pH 3,5 .....	51
<b>Tabela 5.</b> Teor de ferro solúvel em pH 7,0 após digestão gástrica <i>in vitro</i> .....	53
<b>Tabela 6.</b> Teor de proteína nas frações coletadas em IMAC-Fe <sup>3+</sup> .....	56
<b>Tabela 7.</b> Fragmentos identificados nas amostras HPq > 5 kDa e HPq < 5 kDa, proteínas precursoras e sequência completa das mesmas .....	58

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1.    Objetivo geral .....	3
2.2.    Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1.    Ferro .....	4
3.2.    Proteínas do soro de leite .....	6
3.3.    Hidrolisados proteicos de soro de leite.....	7
3.4.    Enzimas proteolíticas.....	9
3.5.    Formação de quelatos .....	10
3.6.    Peptídeos quelantes de ferro.....	12
3.7.    Efeito do pH na quelação de ferro .....	15
3.8.    Biodisponibilidade do ferro quelado .....	16
3.9.    Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) .....	18
3.10.   Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.    Material.....	24
4.2.    Obtenção dos hidrolisados e frações .....	24
4.3.    Determinação de grupos amino livres.....	26
4.4.    Determinação da proteína total .....	27
4.5.    Determinação do perfil aminoacídico .....	27
4.5.1.  Aminoácidos totais .....	27
4.5.2.  Aminoácidos livres.....	28
4.6.    Determinação do perfil de massa molecular .....	28
4.6.1.  Perfil eletroforético.....	28
4.6.2.  Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)..	29

4.7.	Perfil de hidrofiliçidade .....	29
4.8.	Avaliação do potencial de quelação das frações dos hidrolisados .....	30
4.9.	Determinação de ferro .....	31
4.10.	Avaliação da estabilidade do quelato às condições gástricas .....	33
4.11.	Isolamento dos peptídeos por coluna de afinidade IMAC-Fe <sup>3+</sup> .....	33
4.12.	Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas.....	35
4.13.	Análise estatística .....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
5.1.	Caracterização do IPS .....	37
5.2.	Obtenção dos hidrolisados e frações .....	38
5.3.	Perfil aminoacídico.....	39
5.4.	Perfil eletroforético .....	44
5.5.	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	45
5.6.	Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM) .....	48
5.7.	Avaliação do potencial de quelação das frações dos hidrolisados .....	50
5.8.	Avaliação da estabilidade do quelato às condições gástricas .....	52
5.9.	Isolamento dos peptídeos por coluna de afinidade IMAC-Fe <sup>3+</sup> .....	54
5.10.	Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

O ferro é um micronutriente essencial, componente intrínseco da hemoglobina, mioglobina e citocromos (LUO & XIE, 2012). Pode funcionar como regulador, ativador e controlador de várias reações enzimáticas (REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011), além de ter papel importante em funções como transporte de oxigênio e respiração celular (PUIG, ASKELAND & THIELE, 2005). Sua deficiência é responsável por diversas doenças (BEARD, 2001), sendo um dos principais problemas nutricionais no mundo (FAO/WHO, 2007).

Muitos componentes da dieta podem comprometer a absorção de ferro e, portanto, vários estudos têm sido feitos para torná-lo mais biodisponível (POWER, 2006). A suplementação mineral de alimentos com sais de ferro, comumente utilizados no tratamento da anemia, pode causar uma série de efeitos colaterais, como dor de estômago e diarreia. Esses sais geralmente apresentam baixa biodisponibilidade do mineral e, além disso, podem acarretar alterações de sabor e aparência nos produtos em que são empregados (DEWEY, DOMELLÖF, COHEN *et al.*, 2002; MEGÍAS, PEDROCHE, YUST *et al.*, 2007).

Micronutrientes organicamente ligados, incluindo o ferro, possuem biodisponibilidade superior ao mineral livre, sendo mais bem absorvidos no trato digestório de humanos e de outros animais superiores (DAVIS, MCDOWELL, WILKINSON *et al.*, 2008). Em determinadas condições, essa ligação promove a formação de quelatos estáveis e neutros, que protege os micronutrientes das reações químicas que ocorrem durante o processo digestivo, garantindo sua solubilidade no decorrer do trato gastrintestinal até sua absorção (GLIGIC, PALIC & NIKOLOVSKI, 2004).

Com o intuito de elevar a absorção de ferro mediante suplementação, têm-se estudado quelatos ferro-peptídeos, obtidos de diversas fontes proteicas (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002; KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007a; LEE & SONG, 2009; HUANG, REN

& JIANG, 2011; REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011; ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012). A obtenção de peptídeos quelantes de ferro a partir de hidrolisados proteicos pode ser útil no aumento da biodisponibilidade do mineral, enquanto sua estabilidade mantém a qualidade e aparência do alimento (MEGÍAS, PEDROCHE, YUST *et al.*, 2007).

As proteínas de soro de leite são uma fonte de grande interesse para obtenção de peptídeos quelantes de ferro (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007a; SUGIARTO, YE & SINGH, 2009; ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012), pois apresentam elevado valor biológico, elevada digestibilidade e rápida absorção pelo organismo (SGARBIERI, 2004). O presente trabalho teve como objetivo a obtenção e o estudo da capacidade quelante de ferro de peptídeos do soro de leite. Pretende-se, dessa forma, contribuir para o conhecimento das frações dos hidrolisados de maior afinidade ao metal e sua sequência aminoacídica, para futuramente obter quelatos  $\text{Fe}^{2+}$ -peptídeos, que poderão contribuir para elevar a biodisponibilidade deste micronutriente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Obter peptídeos de soro de leite a partir de hidrólise do isolado proteico de soro de leite (IPS) com diferentes enzimas e estudar sua capacidade quelante de ferro.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter, fracionar e caracterizar hidrolisados proteicos de soro de leite com as enzimas alcalase, pancreatina e flavourzyme;
- Avaliar o potencial quelante de ferro das frações dos hidrolisados;
- Avaliar a estabilidade do quelato às condições gástricas;
- Isolar os peptídeos de maior capacidade quelante, por coluna de afinidade por íons  $\text{Fe}^{3+}$  imobilizados (IMAC-  $\text{Fe}^{3+}$ );
- Sequenciar por espectrometria de massas (MS/MS) os peptídeos com afinidade pelo ferro.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Ferro

O ferro é um dos minerais essenciais que podem funcionar como reguladores, ativadores e controladores de várias reações enzimáticas (REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011). Entre as funções do ferro, têm sido citadas a formação dos glóbulos vermelhos, transporte de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, transferência de elétrons, reações de oxidação-redução e produção de energia celular. Além dessas funções, o ferro contribui na proteção ao sistema imunológico, formação de purinas, remoção de lipídios do sangue, produção de anticorpos, absorção de vitamina D em crianças com anemia ferropriva, síntese de DNA e divisão celular (LIEU, HEISKALA, PETERSON *et al.*, 2001).

O ferro representa ao redor de 35 e 45 mg/kg de peso da mulher e do homem, respectivamente (LIEU, HEISKALA, PETERSON *et al.*, 2001). Desse total, 60 a 70%, estão presentes na hemoglobina; 10% na mioglobina, citocromo e enzimas que contêm ferro; e os 20 a 30% restantes estão presentes na forma de reserva como ferritina e hemossiderina (CONRAD, UMBREIT & MOORE, 1999).

A deficiência desse mineral é definida como o estado no qual o indivíduo não possui ferro suficiente para manter normais as funções fisiológicas dos tecidos, tais como sangue, cérebro e músculos (FAO/WHO, 2007). A deficiência de ferro, especialmente a anemia, é um dos principais problemas nutricionais no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência de pessoas anêmicas no mundo, de 1993 a 2005, era de cerca de 2 bilhões de pessoas (FAO/WHO, 2007). A deficiência de ferro tem importantes consequências para a saúde humana e desenvolvimento infantil: mulheres anêmicas e seus filhos apresentam alto risco de morte durante o período pré-natal; o desenvolvimento físico e mental de crianças é atrasado ou comprometido; e a capacidade de trabalho físico e produtividade de trabalhadores manuais podem ser reduzidas (REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011). A anemia contribui, comprovadamente, na queda da

capacidade geral de desempenho dos indivíduos (SIGULEM, TUDISCO, GOLDENBERG *et al.*, 1978).

A fortificação de alimentos, uma das importantes estratégias sustentáveis sugeridas pela OMS, tem sido adotada em muitos países para alcançar as metas de controle de deficiências de micronutrientes, como o ferro (FAO/WHO, 2007). Para suplementação de alimentos com ferro, a Legislação Brasileira permite a utilização de sulfato ferroso desidratado (seco), fumarato ferroso, ferro reduzido, ferro eletrolítico, sódio ferro etileno diamino tetracético (NaFeEDTA), ferro bisglicina quelato e outros compostos de biodisponibilidade não inferior à dos compostos permitidos (BRASIL, 2007).

No Brasil, desde junho de 2004, tornou-se obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico. A Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, estabelece as quantidades mínimas desses nutrientes que devem ser adicionadas às farinhas: 4,2 mg de ferro por 100 g de farinha e 150 mcg de ácido fólico por 100 g de farinha (BRASIL, 2007). O Governo Federal criou o Programa Nacional de Suplementação de Ferro, que consiste na suplementação medicamentosa de sulfato ferroso para todas as crianças de 6 a 18 meses de idade na dosagem de 25 mg de ferro elementar, administrado uma vez por semana, na forma de xarope (BRASIL, 2009). No entanto, o xarope tem baixa aceitação entre as crianças, além de promover efeitos adversos, como fezes escuras, diarreia e pigmentação dos dentes (HOFFMANN & KRUGER, 2011).

A eficácia da fortificação de alimentos com ferro continua sendo um desafio, devido aos problemas recorrentes associados a essa prática, incluindo variação na biodisponibilidade do ferro, alterações sensoriais, formação de sedimentos e o efeito do ferro sobre a oxidação lipídica (SUGIARTO, YE & SINGH, 2009). Isso porque o ferro pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais estão relacionadas às doenças cardiovasculares e neurológicas, além de ter um impacto

negativo no sabor, textura, valor nutricional e vida de prateleira de produtos alimentícios (TORRES-FUENTES, ALAIZ & VIOQUE, 2012).

O sulfato ferroso tem sido utilizado para tratamento da anemia há muitos anos, porém, os efeitos colaterais no sistema gastrointestinal atribuídos ao uso desse sal (como azia, dor abdominal, náusea e diarreia) levam à diminuição da eficácia do tratamento (MIMURA, BREGANÓ, DICHI *et al.*, 2008). Por todos esses fatores, o emprego de agentes quelantes que diminuam o ferro livre e favoreçam a biodisponibilidade do ferro pode apresentar um potencial terapêutico, bem como prevenir seus efeitos pró-oxidantes.

### **3.2. Proteínas do soro de leite**

As proteínas do soro de leite estão entre as proteínas funcionais mais empregadas em formulações alimentícias (KAZMIERSKI & CORREDIG, 2003). Constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (WONG, CAMIRAND, PAVLATH *et al.*, 1996). As principais proteínas do soro do leite são  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e albumina de soro bovina (BSA) (KAZMIERSKI & CORREDIG, 2003) e suas concentrações no leite bovino são 3,2 g/L, 1,2 g/L e 0,4 g/L, respectivamente (KAZMIERSKI & CORREDIG, 2003; SGARBIERI, 2005). As duas primeiras constituem 70 a 80% das proteínas totais do soro. Além delas e da BSA, são encontradas também lactoferrina, imunoglobulinas, protease-peptonas, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996).

A  $\beta$ -Lg, proteína mais abundante do soro de leite, é globular, com massa molecular (MM) igual a 18,36 kDa para a variante genética A e 18,28 kDa para a variante B, contendo 162 resíduos de aminoácidos, um grupo tiol (-SH) e duas pontes dissulfeto intramolecular (-S-S) (SAWYER, BARLOW, BOLAND *et al.*, 2002). A  $\alpha$ -La contém 123 resíduos de aminoácidos e MM igual a 14,18 kDa. Sua molécula de forma elipsoide apresenta quatro pontes dissulfeto. Sua propriedade mais característica é a forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu ponto isoelétrico (SGARBIERI,

2005). A BSA é uma proteína globular solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos e MM igual a 66,2 kDa (SGARBIERI, 2005). Duas características estruturais importantes da BSA são a presença de grupo sulfidril livre e a existência de 17 pontes dissulfeto (MORR & HA, 1993).

Do ponto de vista da composição aminoacídica, as proteínas do soro atendem às recomendações para todas as idades, e apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações da FAO (FAO/WHO, 1990), exceto pelos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Além do elevado valor biológico, as proteínas do soro do leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais (SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro apresentam ações fisiológicas *in vivo*, tais como antioxidante, anti-hipertensiva, antitumoral, protetora da mucosa gástrica contra agressão de agentes ulcerogênicos, virais e bacterianos (SGARBIERI, 2004). Modulam ainda uma variedade de funções, tais como a imunológica, a atividade linfocitária, a secreção de citocinas, a produção de anticorpos e a atividade fagocitária (SAINT-SAUVEUR, GAUTHIER, BOUTIN *et al.*, 2008). A obtenção de peptídeos com propriedades funcionais a partir das proteínas do soro de leite tem sido amplamente estudada nos últimos anos (ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012).

### **3.3. Hidrolisados proteicos de soro de leite**

Muitas pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos para o desenvolvimento de alimentos funcionais (COZZOLINO, LECCE, FRISULLO *et al.*, 2012). Alimentos funcionais são definidos como alimentos que, além da contribuição nutricional básica, apresentam efeitos benéficos sobre uma ou mais funções do organismo, melhorando as condições físicas e/ou diminuindo o risco da evolução de doenças (DIPLOCK, AGGETT, ASHWELL *et al.*, 1999). Os hidrolisados proteicos de soro de leite têm sua funcionalidade destacada

devido à bioatividade de seus peptídeos (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007a). Vários peptídeos considerados bioativos têm sido identificados em hidrolisados de soro de leite, apresentando, por exemplo, atividade antihipertensiva (GOBBETTI, MINERVINI & RIZZELLO, 2004), imunomodulatória (MERCIER, GAUTHIER & FLISS, 2004), anticarcinogênica (MARSHALL, 2004) e carreadora de minerais (KIM & LIM, 2004).

A hidrólise enzimática de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e pectinas, é utilizada para modificar as propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo, melhorando, particularmente, suas características de absorção intestinal (TELLO, CAMACHO, JURADO *et al.*, 1994). Desse modo, um dos critérios utilizados na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é a distribuição do tamanho dos peptídeos, uma vez que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção intestinal (GRIMBLE, KEOHANE, HIGGINS *et al.*, 1986). Boza *et al.* (2000) demonstraram que uma dieta baseada em hidrolisado de soro de leite, contendo especialmente di- e tripeptídeos, foi utilizada mais efetivamente pelo organismo de ratos do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim um maior valor nutritivo.

A escolha da enzima proteolítica é muito importante, pois sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e exposição dos grupamentos laterais hidrofóbicos (HAQUE & MOZAFFAR, 1992). As diferenças de especificidade e ação hidrolítica podem influenciar nas características físico-químicas dos hidrolisados (BERTRAND-HARB, BADAY, DALGALARRONDO *et al.*, 2002), no seu papel biológico (FITZGERALD & MEISEL, 1999) e na habilidade de seus peptídeos em quelar o ferro (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007b).

### 3.4. Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas hidrolisam as ligações peptídicas, havendo discriminação entre os vários tipos de ligações existentes, o que determina a especificidade de cada uma (BERGMANN, 2006). O grau de hidrólise atingido durante a reação de hidrólise, bem como a determinação dos grupos terminais dos peptídeos obtidos, é relacionado à atividade e especificidade da enzima utilizada (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007b).

A enzima alcalase é uma protease bacteriana alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* (SUKAN & ANDREWS, 1982). Essa enzima tem sido amplamente utilizada e é considerada por muitos pesquisadores uma das melhores enzimas na preparação de hidrolisados proteicos, devido principalmente ao seu baixo custo e à obtenção de diversas propriedades funcionais (HOYLE & MERRLTT, 1994; SHAHIDI, HAN & SYNOWIECKI, 1995; KRISTINSSON & RASCO, 2000; YANG, YANG, LI *et al.*, 2011). A alcalase é uma endopeptidase de ampla especificidade, que atua hidrolisando, preferencialmente, a porção carboxi terminal dos aminoácidos ácido glutâmico, metionina, lisina, tirosina e glutamina (ZHU, ZHOU & QIAN, 2006; YANG, YANG, LI *et al.*, 2011).

A enzima flavourzyme é uma protease fúngica complexa produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae*, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas (ŠLIŽYTE, DAUKŠAS, FALCH *et al.*, 2005). Essa enzima apresenta maior atividade de exopeptidases, gerando grande quantidade de aminoácidos livres (NCHIENZIA, MORAWICKI & GADANG, 2010), e tem sido muito usada na produção de hidrolisados proteicos com excelentes propriedades funcionais (KRISTINSSON & RASCO, 2000).

A pancreatina é um complexo enzimático produzido no pâncreas, constituído de lipases, amilases, ribonucleases e proteases (PARK, 2001). As proteases pancreáticas possuem ação de endopeptidases (quimotripsina, tripsina, elastase e colagenase) e de exopeptidases (carboxipeptidases A e B) (YAMAMOTO, 1975). As enzimas carboxipeptidase, tripsina e quimotripsina são classificadas como serina proteases, por

apresentarem cadeias laterais de serina como parte essencial do seu sítio catalítico, e apresentam pH ótimo entre 7 e 9 (ADLER-NISSEN, 1993). A carboxipeptidase A requer um grupo carboxila livre e atua melhor em substâncias contendo um aminoácido aromático à direita da clivagem (DIXON & WEBB, 1964; MATHEWSON, 1998); a tripsina apresenta alta especificidade para as ligações entre o grupo carboxil dos aminoácidos básicos lisina e arginina (DIXON & WEBB, 1964; YAMAMOTO, 1975) e, conseqüentemente, a hidrólise proteica por esta enzima resulta na formação de grandes fragmentos peptídicos cujo C-terminal é lisina ou arginina (ADLER-NISSEN, 1993); a quimotripsina possui atividade específica para as ligações peptídicas adjacentes à carboxila de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (DIXON & WEBB, 1964; YAMAMOTO, 1975).

### **3.5. Formação de quelatos**

A palavra quelato é oriunda do grego “*chele*”, cuja tradução é pinça ou garra. Isso se deve às estruturas dos quelatos, resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante (KRATZER & VOHRA, 1986). O átomo doador de elétrons é chamado átomo ligante e a molécula contendo o átomo ligante é a molécula ligante. Ligantes podem ser considerados como bases de Lewis, as quais podem dividir um par de elétrons com metais, que podem ser considerados como ácidos de Lewis. Assim, a coordenação é resultado da neutralização de um ácido de Lewis com uma base de Lewis (KRATZER & VOHRA, 1986). A doação do par de elétrons, proveniente do mesmo átomo do ligante ao íon de metal, estabelece uma ligação covalente coordenada (DEWAYNE ASHMEAD, 2001).

O ligante é usualmente um ânion ou uma molécula que tem um átomo com um par de elétrons em valências disponíveis. Os quelatos de metal são compostos de coordenação, enquanto, nos sais de metais, o cátion se liga por interação eletrostática. Em um quelato, o ligante doa elétrons ao cátion (DEWAYNE ASHMEAD, 2001). Uma vez

quelado, as características físico-químicas do metal se alteram. Os componentes do quelato compartilham propriedades entre si, porém, conservando propriedades exclusivas (BELL, 1977).

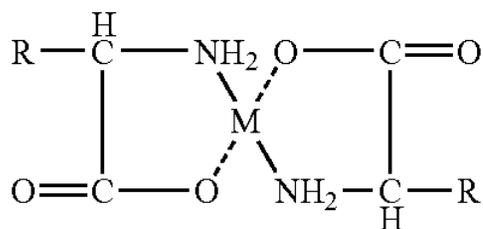
Segundo Dewayne Ashmead (2001), para ser denominado quelato, é necessário que quatro pré-requisitos sejam cumpridos. Os pré-requisitos são: 1) o ligante deve conter dois grupos funcionais capazes de estabelecer ligações covalentes e coordenadas. Os elementos do ligante que geralmente funcionam como doadores são os átomos mais eletronegativos, como nitrogênio ou oxigênio (VAN UITERT & FERNELIUS, 1954; GLUSKER, 1991); 2) deve ser criada uma estrutura em anel, na qual o íon metálico seja o elemento que fecha essa estrutura (AHRENS, 1983); 3) o quelato deve ser estericamente possível. O quelato será relativamente estável se as cargas do íon e dos ligantes estiverem balanceadas e se a razão molar entre ambos for estericamente correta (AHRENS, 1983); 4) a reação de quelação deve ser energeticamente possível. A quantidade de ligantes capazes de se ligar ao metal é definida pelo número de coordenação do metal, que por sua vez é determinado pelo número de orbitais de ligação disponíveis no metal, para combinação com os orbitais do ligante (BELL, 1977).

Complexos formam-se com praticamente todos os metais da tabela periódica (MARTELL & CALVIN, 1952). No entanto, metais de transição são mais bem conhecidos por seus complexos metálicos (KRATZER & VOHRA, 1986). Com relação ao ferro, tanto sua forma divalente quanto a trivalente possuem alta afinidade de ligação a proteínas e outros agentes complexantes, em pH ao redor do neutro. Dentre os principais compostos que podem formar quelatos com o ferro, estão carboidratos, fibras e fitatos, aminoácidos, peptídeos e proteínas. A formação desses quelatos pode influenciar positiva ou negativamente na absorção do ferro pelo organismo, em função das características do quelato formado (KRATZER & VOHRA, 1986).

### 3.6. Peptídeos quelantes de ferro

Existem numerosas substâncias capazes de exercer ação quelante, as quais estão amplamente distribuídas em todos os sistemas vivos na natureza. Dentre elas, podem-se citar ácidos inorgânicos, ácidos orgânicos bicarboxílicos, fosfatos, vitaminas, aminoácidos e peptídeos (KRATZER & VOHRA, 1986). Porém, aminoácidos e pequenos peptídeos resultantes da hidrólise enzimática de proteínas são ligantes ideais, pois em um ambiente aquoso, encontram-se no estado zwitteriônico, com o grupo carboxílico e amino ionizados com cargas opostas e, portanto, ambos os grupos podem participar da reação de quelação com o íon de metal (DEWAYNE ASHMEAD, 2001). A ligação dos peptídeos a íons metálicos é baseada na interação entre um grupo doador de elétrons presente na superfície da proteína e um íon metálico que apresente um ou mais sítios de coordenação acessíveis (UEDA, GOUT & MORGANTI, 2003), assegurando que o átomo de metal se torne parte de uma estrutura biologicamente estável.

Geralmente, a razão molar entre ligante e metal é de, pelo menos, 1:1, porém, preferencialmente, 2:1 ou 3:1. A Figura 1 ilustra a formação mais comum de um quelato entre um aminoácido e um metal divalente, na razão 2:1. As linhas tracejadas representam ligações covalentes coordenadas, ligações covalentes ou ligações iônicas; M representa o metal, como por exemplo,  $\text{Fe}^{2+}$ ; o grupo R representa a cadeia lateral, a qual varia de acordo com o aminoácido (ASHMEAD, 2007).



**Figura 1.** Representação da ligação entre um ligante e um metal. Fonte: Ashmead (2007)

Quando ocorre a ligação entre dois átomos pelo compartilhamento de um par de elétrons, na qual cada átomo contribui com um elétron, essa ligação é denominada

ligação covalente, conforme postulado por Lewis. No compartilhamento de elétrons entre o nitrogênio e átomos de hidrogênio, um par de elétrons do nitrogênio não é compartilhado, o que permite que ele reaja de modo a dividir o par de elétrons livres com algum outro átomo. A ligação então formada também é uma ligação coordenada; porém, devido ao fato de os dois elétrons serem fornecidos por um único átomo, nesse caso, o átomo de nitrogênio, a ligação é denominada ligação covalente coordenada (BASOLO & JOHNSON, 1964).

Na ligação entre um ligante e um metal (Figura 1), o nitrogênio do grupo  $\alpha$ -amino dos aminoácidos envolvidos na ligação contribui com ambos os elétrons, os quais preenchem os espaços disponíveis nos orbitais, formando uma ligação covalente coordenada com o metal. Assim, um íon metálico com valência  $2^+$  pode ser unido por quatro ligações quando totalmente quelado (ASHMEAD, 2007). Isso é possível porque os orbitais do átomo de metal são combinados para formar um novo conjunto de orbitais, denominado orbital híbrido, que forma as ligações covalentes mais estáveis entre metal e ligante (BASOLO & JOHNSON, 1964).

Nesse estado, o quelato é completamente estabilizado pelos elétrons da ligação e a carga do íon metálico, assim como de toda a molécula, torna-se nula. É possível que o íon metálico possa se ligar ao oxigênio carboxílico por ligações covalentes coordenadas ou iônicas. Entretanto, o íon metálico é preferencialmente ligado ao grupo  $\alpha$ -amino apenas por ligações covalentes coordenadas (ASHMEAD, 2007).

A especificidade de formação desses complexos é determinada pelo arranjo espacial dos grupos funcionais dos aminoácidos na sequência dos peptídeos. As interações podem ser aumentadas ou diminuídas modificando-se os resíduos de aminoácidos presentes na sequência peptídica (CARLTON JR & SCHUG, 2011). Proteínas com resíduos de ácido glutâmico, aspártico, serina e histidina podem preferencialmente quelar o ferro, pois este se liga a grupos ricos em oxigênio, como grupo carboxil dos ácidos aspártico e glutâmico, e grupos ricos em nitrogênio, como o anel

imidazol da histidina (ZACHARIOU & HEARN, 1995). A presença de histidina, especialmente no N terminal, é efetiva na quelação, uma vez que o nitrogênio do anel imidazol participa frequentemente da ligação de coordenação com minerais (ZHANG, ZHANG, WANG *et al.*, 2009).

Estudos de complexos ferro-peptídeos mostram que o principal sítio de ligação ao ferro corresponde, primariamente, aos grupos carboxílicos (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002; LEE & SONG, 2009; HUANG, REN & JIANG, 2011), embora o nitrogênio do grupo  $\epsilon$ -amino da lisina, do grupo guanidina da arginina e do grupo imidazol da histidina possam também estar envolvidos na ligação com ferro (REDDY & MAHONEY, 1995; CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002; TORRES-FUENTES, ALAIZ & VIOQUE, 2012).

A quelação do ferro por histidina, ácido glutâmico e aspártico resulta no aumento da absorção de ferro e também pode resultar na redução dos íons férricos para ferrosos (STORCKSDIECK, BONSMANN & HURRELL, 2007). Os grupos -OH da serina ou da treonina são também indicados como sítios de ligação ao ferro de proteínas e peptídeos (CATES, TEODORO & PHILLIPS JR, 2002; KANTARCI, TAMERLER, SARIKAYA *et al.*, 2005; WU, LIU, ZHAO *et al.*, 2012), porém os grupos carboxílicos de ácido glutâmico e aspártico são grupos de coordenação ainda mais fortes (SOVAGO & OSZ, 2006).

Diversas matérias-primas têm sido utilizadas para obtenção de peptídeos com capacidade quelante de metais. Peptídeos de hidrolisados de leite (VEGARUD, LANGSRUD & SVENNING, 2000), caseína (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002), soro de leite (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007b; KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007a; SUGIARTO, YE & SINGH, 2009; OU, LIU, ZHANG *et al.*, 2010), subprodutos de camarão (HUANG, REN & JIANG, 2011; REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011), músculo de frango (SETH & MAHONEY, 2000), músculo de anchova (WU, LIU, ZHAO *et al.*, 2012), plasma de sangue suíno (LEE & SONG, 2009), queijo (LUND & ARDÖ, 2004), soja (LV, LIU, BAO *et al.*, 2009; ZHANG, HUANG & JIANG, 2011) e grão de bico (TORRES-FUENTES, ALAIZ & VIOQUE, 2012) apresentaram capacidade de ligar o ferro.

O mecanismo exato de quelação de hidrolisados com ferro ainda não está completamente elucidado. Reddy & Mahoney (1995) sugerem que as cargas, o comprimento da cadeia lateral e os grupamentos funcionais dos aminoácidos e peptídeos estejam diretamente relacionados à quantidade formada de complexo com ferro. Contudo, além da composição aminoacídica, a atividade quelante dos peptídeos depende de outros fatores, como estrutura do peptídeo, efeitos estéricos e massa molecular (CARRASCO-CASTILLA, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

A quelação de metais parece ser pelo menos parcialmente responsável pela atividade antioxidante que tem sido encontrada em muitos aminoácidos, como tirosina, metionina, histidina, arginina e triptofano (ZHU, CHEN, TANG *et al.*, 2008; HUANG, MAJUMDER & WU, 2010).

### **3.7. Efeito do pH na quelação de ferro**

O pH exerce importante influência na capacidade de ligação dos peptídeos ao ferro (LIN, CHEN & HUANG, 2000). A ligação de coordenação entre peptídeo e metal é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em condição na qual o pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis (PORATH, 1990).

A redução do pH para valores abaixo de 5 promove a precipitação do complexo ferro-peptídeo de soja, porém em pH abaixo de 2 ocorre a re-dissolução do precipitado. Em pH acima de 2, o sal de íon férrico sofre hidrólise, ocasionando a precipitação e insolubilidade do ferro (FRANZAN, 2006). Apenas o ferro solúvel, em moléculas de heme ou ligado a quelatos de baixa MM pode ser absorvido (CARDOSO, 2006). O complexo ferro-peptídeo obtido de hidrolisado enzimático parcial de caseína apresenta características diferenciadas daquelas do sulfato ferroso, ou seja, insolubilidade em pH

ácido e solubilidade em pH de neutro a alcalino. Porém, em ambas as condições de pH, o ferro permanece ligado (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002).

### **3.8. Biodisponibilidade do ferro quelado**

A biodisponibilidade de um nutriente pode ser definida como sua acessibilidade aos processos metabólicos e fisiológicos normais. A biodisponibilidade está relacionada ao efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos de ingestão, mas também pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva (COZZOLINO, 2007).

Micronutrientes organicamente ligados, incluindo o ferro, possuem biodisponibilidade superior ao mineral livre, sendo mais bem absorvidos no trato digestório de humanos e de outros animais superiores (DAVIS, MCDOWELL, WILKINSON *et al.*, 2008). A formação de quelatos estáveis e neutros protege os micronutrientes das reações químicas que ocorrem durante o processo digestivo, garantindo sua solubilidade no decorrer do trato gastrointestinal até sua absorção (GLIGIC, PALIC & NIKOLOVSKI, 2004).

O mecanismo pelo qual o agente quelante melhora a utilização do mineral depende da capacidade de o ligante sequestrar o mineral ou da sua maior habilidade em competir com outros ligantes no trato gastrointestinal (KRATZER & VOHRA, 1986). A absorção, na maioria das vezes, ocorre pela absorção do agente quelante, que leva consigo o metal que a ele se ligou (SECHINATO, 2003). No caso de o quelato ser muito grande para atravessar a membrana na forma intacta, para que a absorção do íon metálico ocorra, este deve ser removido do complexo e ligado a outro ligante de menor massa molecular (KRATZER & VOHRA, 1986). Franzan (2006), em experimentos de reposição de hemoglobina em ratos, concluiu que, no quelato, a força de ligação deve ser suficientemente forte para impedir sua complexação com outros ligantes, tendo que ser,

porém, suficientemente fraca para que possa ser mobilizado por carreadores presentes na parede dos enterócitos.

Muitas pesquisas têm sido feitas para aumentar a biodisponibilidade do ferro e reduzir seus efeitos colaterais. O glicinato ferroso tem disponibilidade duas vezes maior que o sulfato ferroso e menos efeitos colaterais (OLIVARES, PIZARRO, PINEDA *et al.*, 1997; LAYRISSE, GARCÍA-CASAL, SOLANO *et al.*, 2000). Pineda & Ashmead (2001) relataram biodisponibilidade do glicinato ferroso de 90,9% e 26,7% para o sulfato ferroso. O fosfato ferroso de amônia aumenta a absorção do ferro de 3,3% para 7,4% em relação ao pirofosfato férrico, porém, com absorção inferior ao sulfato ferroso, que apresenta absorção de 10,4% (WALCZYK, KASTENMAYER, STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN *et al.*, 2012). O pirofosfato férrico solúvel (SFP) é um quelato férrico solúvel em água em uma ampla faixa de pH e pode ser uma fonte de ferro quando administrado por via intravenosa, como um aditivo para misturas em nutrição parenteral (GUPTA, AMIN, BESARAB *et al.*, 1999). Esse quelato apresentou maior biodisponibilidade do que  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Ferrochel (bisglicinato ferroso) e NaFe-EDTA (Ferro EDTA de sódio) em estudo com células Caco-2 (ZHU, GLAHN, NELSON *et al.*, 2009). Não foram encontrados na literatura, valores para a biodisponibilidade de ferro em quelatos Fe-peptídeos.

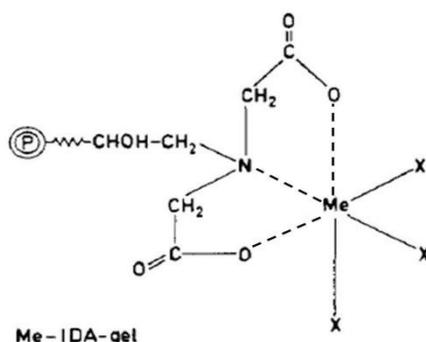
Para ingestão oral, peptídeos ligados ao ferro podem oferecer vantagens em relação às formulações contendo compostos de ferro não heme, tais como o sulfato ferroso, pois melhoram a biodisponibilidade e atenuam os efeitos colaterais em anêmicos (STEPHENSON, 1995). Atualmente, a utilização de hidrolisados proteicos para obtenção de peptídeos com capacidade quelante de ferro tem se tornado um importante foco de estudo (GALLEGOS-TINTORÉ, TORRES-FUENTES, MARTÍNEZ-AYALA *et al.*, 2011; HUANG, REN & JIANG, 2011; REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011; WANG, LI, LI *et al.*, 2011; TORRES-FUENTES, ALAIZ & VIOQUE, 2012; WU, LIU, ZHAO *et al.*, 2012).

### 3.9. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

O isolamento de peptídeos com capacidade quelante de metais pode ser feito através da técnica IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), a qual tem sido largamente utilizada com este propósito (KENIG, PETERNEL, GABERC-POREKAR *et al.*, 2006). Essa técnica de separação e purificação de proteínas, baseada na afinidade destas pelos metais de transição, foi apresentada por Porath *et al.* (1975). A técnica IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelados imobilizados em um suporte sólido (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009).

Nessa técnica, o agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado pelo agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, presentes na estrutura do agente quelante (PORATH, CARLSSON, OLSSON *et al.*, 1975; EUGENE, 1985; WINZERLING, 1992).

Muitos compostos são empregados como agentes quelantes em IMAC, sendo o ácido iminodiacético (IDA) o mais utilizado. O IDA é um agente quelante tridentado (possui um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para a coordenação), isto é, quela o íon metálico ocupando três sítios de coordenação. No caso de íons metálicos hexacoordenados, com três sítios ocupados, há disponibilidade para a biomolécula interagir com os outros três sítios remanescentes (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009), como é mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Representação diagramática de um adsorvente de IMAC (gel de IDA-Me). Me – metal; P – suporte cromatográfico insolúvel e X – H<sub>2</sub>O, íons de solução tampão ou resíduo aminoacídico da proteína. - - - Sítios remanescentes. Fonte: adaptado de Porath & Olin (1983).

Proteínas ou outros solutos introduzidos na fase móvel são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelados, havendo também a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (UEDA, GOUT & MORGANTI, 2003). Os efeitos eletrostáticos são mais intensos quando se emprega uma fase móvel com baixa força iônica (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009).

Embora a separação de proteínas por IMAC seja principalmente baseada em forças de interação entre seus resíduos de aminoácidos e os íons metálicos ligados à coluna, muitos outros fatores influenciam a formação desse complexo e consequente retenção dessas proteínas à coluna (KAGEDAL, 1998), como pH (LIN, CHEN & HUANG, 2000), concentração de sal (CHEN, WU & LIU, 1996) e tampão de eluição (ZACHARIOU & HEARN, 1995).

O pH tem papel razoavelmente complexo na eluição e adsorção de proteínas, porque é influenciado por um número de propriedades, incluindo o comportamento nucleofílico dos componentes do tampão, as propriedades de doador-receptor de elétrons dos solutos e estabilidade do metal (WONG, ALBRIGHT & WANG, 1991). Como as ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados podem ocorrer

simultaneamente com interações eletrostáticas, a adsorção de proteínas em IMAC se torna dependente do pH (PORATH, 1990).

O aumento da força iônica dos tampões pode conduzir à supressão de interações secundárias, eletrostaticamente indesejáveis, enquanto aumenta a ligação de proteínas aos complexos quelatos, sendo que a concentração decrescente de sal pode até resultar em menor adsorção de proteína (ARNOLD, 1991; WONG, ALBRIGHT & WANG, 1991). A seletividade de IMAC por uma proteína também depende da composição da fase móvel, sendo que os tampões acetato e fosfato são os mais comumente utilizados (WONG, ALBRIGHT & WANG, 1991).

A força da ligação entre metal e ligante é governada pela avaliação da força ou fraqueza intrínseca dos átomos envolvidos. Ligações entre átomos com avaliação similar (por exemplo, ácido forte com base forte) são as mais fortes, sendo os íons metálicos, como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , classificados como ácidos fortes de Lewis (UEDA, GOUT & MORGANTI, 2003). Ácidos fortes de Lewis preferem grupos ricos em oxigênio, como grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico ou o oxigênio de grupos fosfato. Resíduos de ácido aspártico ou glutâmico apresentam capacidade de ligação ao  $Fe^{3+}$  imobilizado em IDA, porém, em pHs muito inferiores aos utilizados para adsorção de histidina e triptofano (RAMADAN & PORATH, 1985).

Após a adsorção, as moléculas retidas podem ser liberadas utilizando-se agente competidor, como imidazol, ou tampão adequado (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009). A força da ligação metal-proteína varia de proteína para proteína e, em muitos casos, essa diferença pode ser explorada para obter separação e isolamento efetivos de proteínas específicas (KAGEDAL, 1998). A separação dos peptídeos quelantes ocorre em função da presença de grupos acessíveis de histidina, serina, cisteína, ácido aspártico e glutâmico (SWAIN, TABATABAI & REDDY, 2002; STORCKSDIECK, BONSMANN & HURRELL, 2007). Esses resíduos devem estar disponíveis na superfície das

biomoléculas com vista à formação de interações com os metais de transição (JERKER, 1992).

Na etapa de dessorção, a eluição por diminuição do pH ocasiona a protonação das espécies doadoras de elétrons, podendo ser um método eficiente para dessorver proteínas que interagem com íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  imobilizados. Porém, para cromatografias realizadas com íon metálico  $\text{Fe}^{3+}$ , as proteínas podem ser eluídas por aumento do pH (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009).

A purificação de peptídeos com capacidade quelante pode aumentar a biodisponibilidade de metais como cálcio, ferro e zinco (FAIRWEATHER-TAIT & TEUCHER, 2002). Desse modo, peptídeos quelantes purificados a partir de hidrolisados proteicos podem ser úteis no aumento da biodisponibilidade e, conseqüentemente, na eficiência da absorção do ferro (MEGÍAS, PEDROCHE, YUST *et al.*, 2007).

### **3.10. Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas**

Uma vez separados os peptídeos com alto potencial quelante, é possível identificar os diferentes aminoácidos que os compõem, através da técnica de espectrometria de massas, e, assim, analisar quais resíduos aminoacídicos apresentam maior afinidade de ligação ao ferro no material de estudo. Essa técnica permite a identificação de compostos pela formação de íons e com separação e detecção baseada na relação massa/carga ( $m/z$ ) em fase gasosa (AEBERSOLD & MANN, 2003; KICMAN, PARKIN & ILES, 2007). O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados, tendo como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações  $m/z$  (CANTÚ, CARRILHO, WULFF *et al.*, 2008).

O uso da espectrometria de massas para análise de biomoléculas como proteínas e peptídeos iniciou-se na década de 90 (KICMAN, PARKIN & ILES, 2007) e as fontes de

ionização empregadas para essa finalidade são ESI (*Electrospray Ionization*) (FENN, MANN, MENG *et al.*, 1989) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (KARAS & HILLENKAMP, 1988). Ambas as técnicas permitem que os compostos a serem analisados sejam brandamente ionizados, fazendo com que as moléculas permaneçam relativamente intactas durante o processo de ionização (KICMAN, PARKIN & ILES, 2007).

A fonte de ionização por ESI produz um fino spray de gotas altamente carregadas, produzidas pela aplicação de voltagem no capilar. Com a evaporação do solvente, as cargas são transferidas para as moléculas, transformando-as em íons na fase gasosa (DASS, 2007). No caso da ionização por MALDI, a amostra é analisada dispersa em uma matriz, que absorve energia no comprimento de onda do laser utilizado. Assim, o laser transfere energia para a matriz, sublimando-a. Na fase gasosa ocorre a transferência de carga da matriz para as moléculas do analito, promovendo a ionização (KARAS, BAHR & GIEßMANN, 1991). ESI aplicada à análise de peptídeos produz preferencialmente espécies duplamente carregadas, enquanto MALDI gera quase que exclusivamente íons monocarregados (CANTÚ, CARRILHO, WULFF *et al.*, 2008).

Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis. A função básica dos analisadores é separar os íons formados de acordo com suas relações  $m/z$  (CANTÚ, CARRILHO, WULFF *et al.*, 2008). O princípio físico utilizado em cada analisador determina a resolução dos espectros obtidos, entendendo como resolução a capacidade de separar sinais adjacentes, e a exatidão, definida por quão próximo o valor experimental é próximo do valor teórico na determinação da massa do íon (WATSON & PARKMAN, 2007).

A partir da obtenção do espectro de massas dos peptídeos, tem-se a relação  $m/z$  desses e, por consequência, a sua MM. Os peptídeos previamente detectados, chamados de íons precursores, são, então, isolados e submetidos à fragmentação por colisão com

moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. O espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS. Ao final do processo, os resultados inerentes à MM dos peptídeos, bem como a informação relativa à sequência de aminoácidos dos peptídeos contida nos espectros de fragmentação (MS/MS) são usados pelos *softwares* de busca para localizar as proteínas nos bancos de dados (CANTÚ, CARRILHO, WULFF *et al.*, 2008). Os softwares mais conhecidos e comumente empregados são o Sequest (ENG, MCCORMACK & YATES III, 1994) e o Mascot (PERKINS, PAPPIN, CREASY *et al.*, 1999).

Atualmente, a espectrometria de massas tem sido muito utilizada para identificação de peptídeos com capacidade quelante, permitindo o conhecimento da sequência de aminoácidos que podem estar envolvidos na reação de quelação (LEE & SONG, 2009; LV, LIU, BAO *et al.*, 2009; WANG, LI & AO, 2012; WU, LIU, ZHAO *et al.*, 2012; ZIDANE, MATÉOS, CAKIR-KIEFER *et al.*, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

Para este estudo, foi utilizado isolado proteico de soro de leite (IPS) PROVON® (Glanbia Nutritionals, Kilkenny, Irlanda). As enzimas proteolíticas utilizadas para hidrólise do IPS foram flavourzyme (produzida por *Aspergillus oryzae*), gentilmente cedida pela empresa Novozymes® Latin America Ltda. (Araucária, PR, Brasil), alcalase (produzida por *Bacillus licheniformis*) e pancreatina de origem suína, ambas adquiridas da Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, EUA).

Os reagentes tricina, pepsina, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido bicinconínico (BCA), oftaldialdeído (OPA) e albumina de soro bovina (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, EUA). A ortofenantrolina foi adquirida da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Ácido tricloroacético (TFA),  $\beta$ -mercaptoetanol, Comassie Brilliant Blue G250 e ureia foram adquiridos da Merck (Hohenbrunn, Alemanha). A bis-acrilamida foi adquirida da Amresco (Solon, Ohio, EUA). A acrilamida e tris base da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). A acetonitrila e o cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) da J. T. Baker (Center Valley, PA, EUA). A  $\alpha$ -lactoalbumina foi gentilmente cedida pela Davigo Foods International Inc. (Le Sueur, MN, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico.

### 4.2. Obtenção dos hidrolisados e frações

Os hidrolisados foram obtidos a partir da hidrólise enzimática de isolado proteico de soro de leite bovino (IPS) com as enzimas alcalase, pancreatina e flavourzyme, sob condições específicas para cada enzima. As condições de pH, temperatura e relação enzima:substrato (E/S) foram as seguintes: pH 8,0, 60 °C e E/S 1% para alcalase; pH 8,0, 40 °C e E/S 4% para pancreatina; pH 6,7, 55 °C e E/S 4% para flavourzyme. A seleção

das condições foi baseada nos resultados de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> realizado em estudos preliminares.

O IPS (10% m/v) foi dissolvido em água deionizada e a solução colocada em béquer encamisado no equipamento pH Stat - Titulador Automático modelo DL 21 Grafix (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Suíça), com sistema de agitação e aquecimento por meio de acoplamento com banho termostatizado. O pH foi ajustado com 2 mol/L NaOH até o valor previamente definido para cada ensaio. Durante a reação de hidrólise, o pH foi mantido constante através da adição de 2 mol/L NaOH e o consumo de base monitorado pelo equipamento. O grau de hidrólise (GH) foi definido pela Equação 1 (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\mathbf{GH\ (\%)} = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: GH (%) = grau de hidrólise; B = consumo de base em mL; N<sub>b</sub> = normalidade da base; 1/α = média de grau de dissociação do grupo α-NH<sub>2</sub>; MP = massa da proteína em g; h<sub>tot</sub> = número total de ligações peptídicas no substrato proteico - 8,8 para proteína do soro de leite (ADLER-NISSEN, 1986).

Após o final da reação, os hidrolisados foram centrifugados a 17000x g/15 min em centrífuga modelo RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA), filtrados em membrana de celulose regenerada (poro de 0,45 μm; Schleicher & Schüll, Dassel, Alemanha) e o sobrenadante foi posteriormente fracionado em sistema de ultrafiltração Pellicon® (Millipore, Bedford, MA, EUA), com membrana de corte molecular de 5 kDa. As frações obtidas, permeado (< 5 kDa) e retido (> 5 kDa), foram liofilizadas em Liofilizador Edwards - super Modulyo (West Sussex, RU).

### 4.3. Determinação de grupos amino livres

A concentração de grupos amino livres foi determinada a partir do método baseado na reação de oftaldialdeído (OPA), descrito por Nielsen e Dammann (2001). O teor de grupos amino livres foi obtido pela Equação 2:

$$\text{Grupos amino livres (meqv NH}_2\text{/ g proteína)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs padrão} - \text{Abs branco})} \times 0,9516 \text{ meqv/L} \times 0,1 \times \frac{100}{M} \times P \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: M = m amostra (g); P = % proteína na amostra; 0,1 = volume de amostra (L).

Utilizando-se as Equações 3 e 4 calculou-se o GH das amostras analisadas:

$$\text{GH (\%)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$h = \frac{(\text{grupos amino livres} - \beta)}{\alpha \text{ meqv/g proteína}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: GH (%) = grau de hidrólise; h = número de ligações peptídicas clivadas durante o processo de hidrólise; h<sub>tot</sub> = número total de ligações peptídicas no substrato proteico - 8,8 para proteínas do soro de leite (ADLER-NISSEN, 1986); constantes α e β = 1,0 e 0,4, respectivamente, para proteínas do soro de leite (NIELSEN, PETERSEN & DAMMANN, 2001).

O GH das amostras foi corrigido subtraindo-se o teor dos aminoácidos livres (Σ meq de aminoácidos livres/g proteína). A partir do GH corrigido, calculou-se, utilizando a Equação 5, o comprimento médio das cadeias peptídicas (CCP), em número de resíduos de aminoácidos por peptídeo (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\text{CCP} = \frac{100}{\text{GH corrigido (\%)}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: CCP = comprimento da cadeia peptídica; GH corrigido (%) = grau de hidrólise corrigido pela subtração do teor dos aminoácidos livres ( $\Sigma$  meq de aminoácidos livres/g proteína).

#### 4.4. Determinação da proteína total

O teor de nitrogênio total das amostras foi determinado pelo método oficial de micro-Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,38 (AOAC, 2006).

#### 4.5. Determinação do perfil aminoacídico

##### 4.5.1. Aminoácidos totais

A determinação da composição dos aminoácidos totais foi feita pela metodologia de derivatização pré-coluna dos aminoácidos liberados após a hidrólise ácida das proteínas (6 mol/L HCl), sob aquecimento (110 °C/20 h). A análise de aminoácidos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), com coluna C<sub>18</sub> LUNA 100 Å (4,6 mm x 250 mm; partícula de 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), de acordo com o método descrito por White *et al.* (1986) para amostras alimentícias. Os aminoácidos foram quantificados por comparação com padrão de aminoácidos Thermo Scientific (Rockford, EUA). Utilizou-se ácido DL-2-aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, EUA), como padrão interno.

Na hidrólise ácida com fenol, ocorre a liberação dos aminoácidos, com exceção do triptofano, que é completamente destruído. A determinação de triptofano foi feita após hidrólise enzimática com pronase (40 °C/22-24 h), seguido de reação colorimétrica com 4-

dimetilaminobenzaldeído (DAB) em 10,55 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e leitura a 590 nm. O teor de triptofano foi calculado a partir de uma curva padrão de L-triptofano (SPIES, 1967).

#### 4.5.2. Aminoácidos livres

A análise de aminoácidos livres foi feita segundo metodologia descrita por Hagen et al. (1993). Após hidrólise com 6 mol/L HCl por 24 h, a quantificação de aminoácidos livres foi feita por calibração interna multinível, com auxílio de metionina sulfona como padrão interno. As amostras foram desproteinizadas com metanol acidificado com HCl 0,1 mol/L (80% MeOH /20% 0,1 mol/L HCl) a uma proporção de 7:2:1 metanol/amostra/padrão interno. Foi utilizado equipamento HPLC da Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, EUA), com coluna LUNA C<sub>18</sub> 100Å (250 mm x 4,6 mm; 00G-4252-EQ; partícula de 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

#### 4.6. Determinação do perfil de massa molecular

##### 4.6.1. Perfil eletroforético

O perfil eletroforético do IPS foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), enquanto os hidrolisados e suas respectivas frações foram analisados por sistema SDS-PAGE-Tricina, específica para separação de peptídeos de baixa MM (CLAEYS, DE SMET, BALCAEN *et al.*, 2004).

No sistema SDS-PAGE-Tricina foram utilizados géis de poliacrilamida de diferentes concentrações: gel de separação (16%T e 3%C) com 6 mol/L ureia, gel espaçador (10%T e 3%C) e gel de empilhamento (4% T e 3%C). As amostras foram diluídas em tampão redutor (0,5 mol/L Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0,1% Comassie Blue G250), aquecidos a 90 °C por 5 min. O volume de amostra aplicado foi de 5 µL. Após as corridas, os géis foram fixados por 1 h em solução

metanol/ácido acético/água (5:1:4) e corados por Comassie Blue G250 (0,025% de Comassie Blue em 10% ácido acético). Posteriormente, foram descorados em 10% ácido acético. Como padrão de MM foi utilizado Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

#### **4.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)**

Os hidrolisados e suas respectivas frações foram avaliados por cromatografia líquida de exclusão molecular (CLAE-EM), a fim de se verificar sua distribuição de MM. Foi utilizado Sistema de HPLC Agilent, Sistema de bombas quaternário, Semi Preparativo e Analítico com Detector por Arranjo de Diodos (DAD) (Waldbronn, Alemanha), com coluna Protein-Pak™ 60 Å (7,8 mm x 300 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) (faixa de separação de 1-20 kDa) e tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 6,8 como fase móvel. O fluxo foi de 1 mL/min e o monitoramento a 214 nm. O volume de injeção de amostra foi de 20 µL (3 mg/mL) e o tempo de corrida igual a 20 min.

#### **4.7. Perfil de hidrofiliicidade**

O perfil de hidrofiliicidade dos hidrolisados e das frações obtidas por ultrafiltração foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) em Sistema de HPLC Agilent, Sistema de bombas quaternário, Semi Preparativo e Analítico com Detector por Arranjo de Diodos (DAD) (Waldbronn, Alemanha), com coluna C<sub>18</sub> Microsorb – MV™ (4,6 mm x 250 mm; partícula de 5 µm) (Rainim, Woburn, MA, EUA).

A composição dos solventes foi: solvente A - 0,04% de ácido trifluoracético (TFA) em água Milli-Q; solvente B - 0,03% TFA em acetonitrila, filtrados em membrana 0,45 µm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). A coluna foi mantida em temperatura ambiente,

com fluxo de 1 mL/min, com detecção em 214 nm, volume de injeção de 50 µL sendo equilibrada com 100% do solvente A. As amostras (3 mg proteína/mL para hidrolisados e frações e 1mg/mL para IPS íntegro) foram eluídas em gradiente linear até 70% do solvente B em 40 min, retornando a 100% de solvente A aos 45 min. Nos 15 min seguintes, manteve-se a fase móvel em solvente A, a fim de reestabelecer as condições iniciais.

#### **4.8. Avaliação do potencial de quelação das frações dos hidrolisados**

A reação de quelação entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e frações dos hidrolisados foi baseada na metodologia utilizada por alguns estudos de quelação Fe-peptídeos (LEE & SONG, 2009; HUANG, REN & JIANG, 2011; REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011; ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012), com proporção proteína:ferro de 40:1 (ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012). A fonte de ferro utilizada foi  $\text{FeCl}_2$  (MORALES, FERNÁNDEZ-FRAGUAS & JIMÉNEZ-PÉREZ, 2005; LEE & SONG, 2009; REN, HUANG, JIANG *et al.*, 2011), pois o ferro na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) apresenta maior solubilidade e é mais facilmente absorvido do que na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Além disso,  $\text{Fe}^{2+}$  apresenta menor tendência à formação de compostos insolúveis do que  $\text{Fe}^{3+}$  (BRISE & HALLBERG, 1962; FUQUA, VULPE & ANDERSON, 2012).

Uma solução contendo 4% de proteína teve o pH ajustado para 7,0 com NaOH e foi adicionada de 0,1% de ferro ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), e o pH foi novamente ajustado para 7,0. A solução foi mantida sob agitação constante a  $25 \pm 2$  °C, durante 60 min, com ajuste de pH a cada 15 min. Após esse período, a solução foi centrifugada ( $5000 \times g/20$  min) e o sobrenadante analisado quanto ao teor de ferro, pelo método colorimétrico da ortofenantrolina (item 4.9), e teor de proteína, pelo método de Kjeldahl.

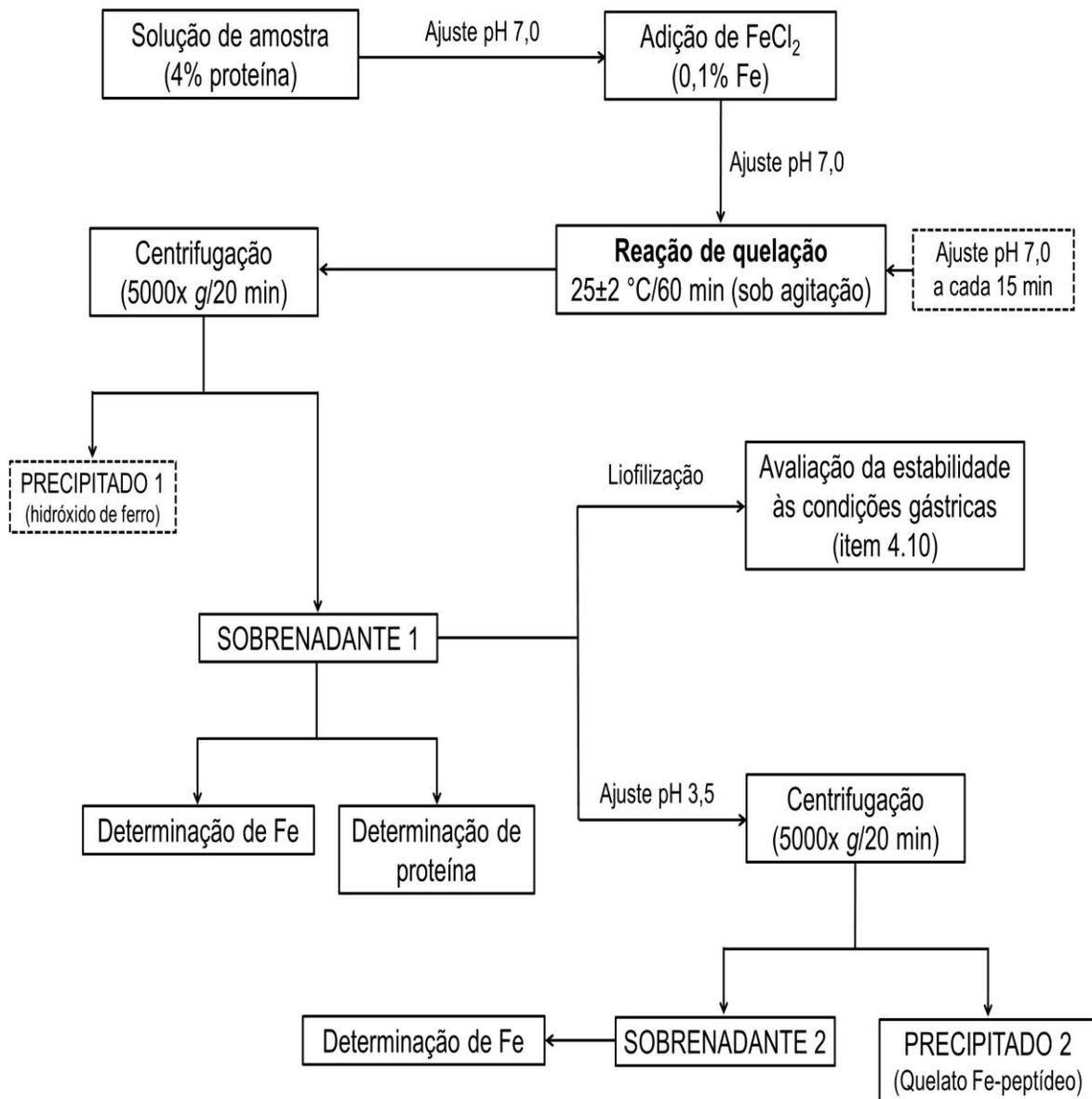
Os sobrenadantes obtidos foram divididos em duas partes: uma foi liofilizada e utilizada para avaliação da estabilidade do quelato às condições gástricas (item 4.10) e a outra teve seu pH ajustado para 3,5 e foi centrifugada ( $5000 \times g/20$  min) para determinação do teor de ferro solúvel. Essa etapa foi realizada para avaliar se o ferro

solúvel em pH 7,0 estava complexado ou apenas fracamente ligado aos peptídeos. O ferro determinado no sobrenadante foi considerado como ferro livre e o ferro precipitado, como ferro quelado (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002). O ferro no precipitado foi avaliado por diferença entre o ferro utilizado na reação de quelação e o ferro no sobrenadante.

#### 4.9. Determinação de ferro

O ferro em solução foi determinado pelo método colorimétrico da ortofenantrolina (ATKINS, 1975), utilizando-se  $\text{FeCl}_2$  como padrão. A curva padrão foi construída com concentrações entre 1-5 mg Fe/L. A reação foi feita em balões volumétricos de 10 mL, a partir da adição de amostra (volume adequado para obter concentração entre 2 e 4 mg Fe/L), 2 mL de tampão acetato de sódio 0,5 mol/L pH 4,7, 800  $\mu\text{L}$  de solução de ácido ascórbico 1%, para garantir a redução de toda espécie  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , e 400  $\mu\text{L}$  de solução 0,25% de ortofenantrolina. Após 20 min em repouso, foi realizada leitura em triplicata, a 510 nm.

A Figura 3 apresenta o fluxograma da obtenção do quelato  $\text{Fe}^{2+}$ -peptídeo, pela reação de quelação e precipitação do quelato



**Figura 3.** Fluxograma de obtenção de quelato  $\text{Fe}^{2+}$ -peptídeo.

#### 4.10. Avaliação da estabilidade do quelato às condições gástricas

Os liofilizados dos sobrenadantes da reação de quelação das amostras > 5 kDa e < 5 kDa do hidrolisado com pancreatina (HP > 5 kDa e HP < 5 kDa) foram submetidos à digestão gástrica, a fim de se avaliar a estabilidade do quelato formado, em função da manutenção da solubilidade do ferro. Foram realizados ensaios controle da enzima (digestão sem amostra), controles do ferro (solução de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  com e sem enzima), além dos ensaios com as amostras com e sem enzima. Para a digestão, utilizou-se 5,9 mg proteína/mL. Assim, o teor de ferro nas amostras avaliadas variou entre 50-60  $\mu\text{g}$  Fe/mL. Como controle, realizaram-se experimentos somente com  $\text{FeCl}_2$  (100  $\mu\text{g}$  Fe/mL).

A digestão gástrica *in vitro* foi realizada conforme descrito por Martos *et al.* (2010) com adaptações. A digestão foi realizada em equipamento Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), em tubos Falcon de 15 mL. As amostras liofilizadas foram solubilizadas em fluido gástrico (35 mmol/L NaCl pH 2,0) na concentração de 5,9 mg proteína/mL e tiveram seu pH ajustado para 2,0 com 1 mol/L HCl.

Após 15 min a 37 °C, adicionou-se solução de pepsina (E:S 1:20 m/m). As amostras permaneceram a 37 °C por 60 min a 400 rpm. O pH das amostras foi então ajustado para 7,0 com 1 mol/L NaOH, o volume acertado para obter-se concentração final de 3,9 mg proteína/mL e as amostras centrifugadas a 5000x *g*/20 min. O teor de ferro no sobrenadante foi determinado pelo método colorimétrico da ortofenantrolina (item 4.9).

#### 4.11. Isolamento dos peptídeos por coluna de afinidade IMAC- $\text{Fe}^{3+}$

A partir dos resultados da capacidade quelante das frações dos hidrolisados, foram selecionadas as frações HP > 5 kDa e HP < 5 kDa. Os peptídeos dessas frações foram isolados por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), segundo metodologia descrita por Lv *et al.* (2009) com adaptações.

O isolamento foi realizado em Sistema FPLC ÄKTA prime plus (GE Healthcare Bio-Sciences, Björkgatan, Suécia) com detecção fixada em 280 nm. Uma coluna XK 16 (Pharmacia, Suécia) foi empacotada com 20 mL de resina *Iminodiacetic Acid Sepharose*® (Sigma-Aldrich®; St.Louis, MO, EUA) e lavada com água miliQ (mínimo 6 volumes de coluna). A seguir, carregou-se a coluna com 30 mL de solução 200 mmol/L FeCl<sub>3</sub> previamente filtrada em membrana 0,45 µm (Schleicher e Schüll, Dassel, Alemanha). O fluxo foi mantido em 1 mL/min.

A coluna foi então lavada com 8-9 volumes de coluna de água miliQ, a fim de eliminar o ferro não quelado à resina, e, em seguida, com tampão acetato de sódio – ácido acético 50 mmol/L pH 4,0, com o intuito de eliminar o ferro fracamente retido à coluna. O sistema foi então condicionado com tampão de adsorção (ou de equilíbrio) (tampão acetato de sódio - ácido acético 50 mmol/L pH 5,5 com 0,1 mol/L NaCl) (LV, LIU, BAO *et al.*, 2009). A adição de NaCl ao tampão aumenta a força iônica e leva à diminuição ou supressão das interações eletrostáticas, favorecendo a predominância de ligações de coordenação entre íons metálicos imobilizados e peptídeos (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009), aumentando assim a seletividade da análise.

Alíquotas de 2 mL (50 mg proteína/mL) foram carregadas na coluna. A primeira fração eluída corresponde aos peptídeos não adsorvidos na coluna e, portanto, com menor potencial de ligação ao ferro. Os peptídeos quelados foram posteriormente eluídos com tampão de dessorção (ou de eluição) (solução 20 mmol/L de fosfato de sódio dibásico). O fluxo para eluição da amostra foi de 1 mL/min. Após a eluição dos peptídeos, a coluna foi lavada com água miliQ e posteriormente regenerada com solução 50 mmol/L de EDTA.

A determinação de proteína das frações coletadas em IMAC-Fe<sup>3+</sup> foi feita pelo método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando-se BSA como padrão, segundo Smith *et al.* (1985). As frações com capacidade quelante da amostra > 5 kDa do hidrolisado com

pancreatina (HPq > 5 kDa) e < 5 kDa do hidrolisado com pancreatina (HPq < 5 kDa) foram coletadas em coletor automático e posteriormente liofilizadas.

#### **4.12. Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas**

Anteriormente ao sequenciamento por espectrometria de massas, as amostras HPq < 5 kDa e HPq > 5 kDa foram dessalinizadas, a fim de reduzir ao máximo os sais presentes nas amostras, os quais podem comprometer a identificação dos peptídeos, pela interferência provocada na ionização. A dessalinização foi realizada em coluna Sep-Pak C<sub>18</sub>, cartucho de 100 mg, partícula de 55-105 µm (WAT023590, Waters Corporation, MA, EUA). O cartucho foi ativado com acetonitrila 100% e equilibrado com 50% acetonitrila / 0,1% ácido fórmico e 0,1% TFA. O volume de amostra foi 300 µL (800 µg de amostra em 0,1% TFA). A seguir, o cartucho foi lavado com 0,1% TFA e ácido 0,1% fórmico. A eluição da amostra foi realizada com 50% acetonitrila / 0,1% ácido fórmico e 80% acetonitrila / 0,1% ácido fórmico. O eluído foi coletado e seco em equipamento Speed Vac (SPD 1010 speed vac system – Thermo Scientific) e posteriormente ressuspenso em 0,1% ácido fórmico para análise de espectrometria de massas.

Os peptídeos foram separados por perfil de hidrofobicidade em coluna C<sub>18</sub> (100 µm x 100 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) em nano Acquity Ultra Performance LC (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a uma interface de ionização por ESI nanospray em um espectrômetro de massas com analisador Q-TOF Ultima (MicroMass/Waters Corporation). Alíquotas de 4,5 µL de amostra foram injetadas automaticamente e os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 60 min sob fluxo de 0,6 mL/min.

Os arquivos de dados gerados pelo Q-TOF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltda.). Para a identificação das proteínas, foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltda.), com 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MS/MS. As buscas

foram realizadas utilizando o banco de dados *Bostaurus* (51274 sequências; 19497864 resíduos). O equipamento foi operado em modo MS positivo, com aquisição de dados contínua na faixa de  $m/z$  de 100-2000 Da. Os cromatogramas foram apresentados em BPI (*Base Peak Intensity Chromatogram*).

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) (Campinas-SP).

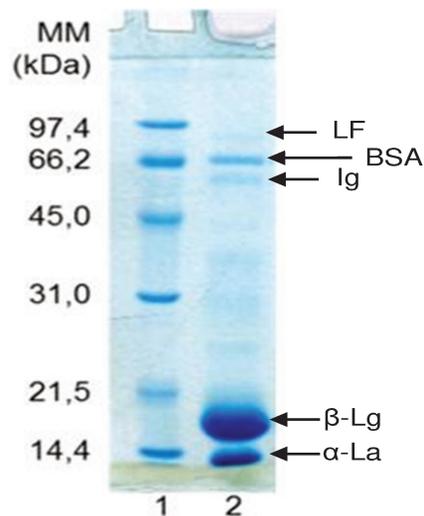
#### **4.13. Análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*; SPSS 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL), por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do IPS

O componente majoritário do IPS e de maior interesse para este trabalho são as proteínas, e seu teor, determinado pelo método Kjeldahl, corresponde a  $87,6 \pm 0,4\%$ . A Figura 4 apresenta o perfil eletroforético SDS-PAGE do IPS. É possível observar duas bandas mais intensas, com aproximadamente 14 e 18 kDa, correspondentes às suas principais proteínas,  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), respectivamente. Outra banda, menos intensa, com aproximadamente 66 kDa corresponde à albumina de soro bovina (BSA). Há ainda duas bandas com aproximadamente 55 kDa e 86 kDa, correspondentes a bandas de cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) e lactoferrina (LF), respectivamente (BASCH, DOUGLAS JR, PROCINO *et al.*, 1985; KINGHORN, NORRIS, PATERSON *et al.*, 1995).



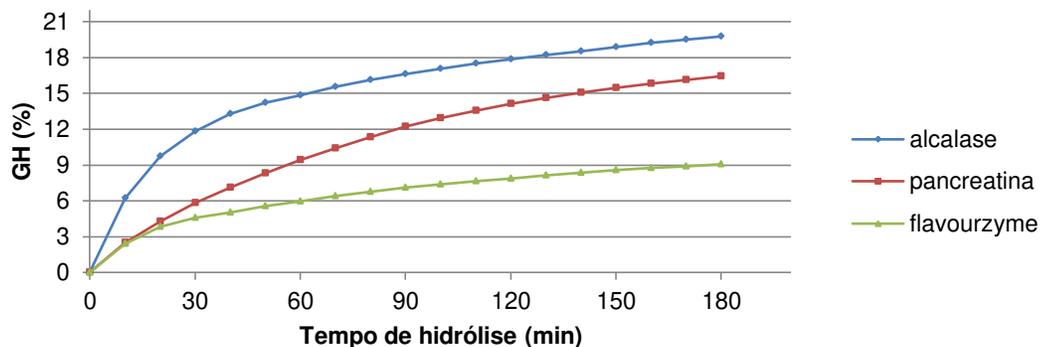
**Figura 4.** Eletroforese (SDS-PAGE em meio redutor) do isolado proteico de soro de leite (IPS). Gel de separação 12%. (1) padrão de massa molecular; (2) isolado proteico de soro de leite (IPS).

## 5.2. Obtenção dos hidrolisados e frações

Foram utilizadas neste estudo três proteases de origens diferentes e com diferentes perfis de ação hidrolítica, uma vez que a ação específica de cada enzima influencia a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e exposição dos grupamentos laterais hidrofóbicos (HAQUE & MOZAFFAR, 1992).

A enzima alcalase é uma endopeptidase (SMYTH & FITZGERALD, 1998), enquanto a flavourzyme é uma exopeptidase, (NCHIENZA, MORAWICKI & GADANG, 2010). A pancreatina é um sistema enzimático composto por enzimas com atividade tanto de endo quanto de exopeptidase (YAMAMOTO, 1975). Essas diferenças de especificidade e ação hidrolítica podem influenciar nas características físico-químicas dos hidrolisados (BERTRAND-HARB, BADAY, DALGALARRONDO *et al.*, 2002), em seu papel biológico (FITZGERALD & MEISEL, 1999) e na habilidade de seus peptídeos em quelar o ferro (KIM, SEO, KHAN *et al.*, 2007b).

As curvas de hidrólise do IPS com as três enzimas estão na Figura 5. A alcalase apresentou maior atividade hidrolítica desde os primeiros minutos de hidrólise, tendo atingido, após 180 min, o maior GH, sendo seguida pela pancreatina e flavourzyme.



**Figura 5.** Curvas de hidrólise do isolado proteico de soro de leite (IPS) com as enzimas alcalase (pH = 8,0; E/S = 1%; 60 °C; 105 min), pancreatina (pH = 8,0; E/S = 4%; 40 °C; 180 min) e flavourzyme (pH = 6,7; E/S = 4%; 55 °C; 180 min). E/S = relação enzima/substrato (m/m). Os valores expressos no gráfico são média de 3 hidrólises para cada enzima.

Para obtenção dos hidrolisados, o tempo de hidrólise foi definido em 105 min para a alcalase e 180 min para a pancreatina, tendo em vista a obtenção de GH semelhante para os hidrolisados. Contudo, com a enzima flavourzyme, o GH foi inferior ao obtido com as outras duas enzimas, não havendo aumento expressivo do GH após 60 min. Nessas condições, com a alcalase, o GH atingido foi de 16,8% em 105 min, com a pancreatina 16,4% em 180 min e, com a flavourzyme, 9,1% em 180 min, indicando a menor atividade hidrolítica desta última.

Os hidrolisados obtidos foram ultrafiltrados, a fim de se obterem frações de diferentes faixas de MM ( $> 5$  KDa e  $< 5$  kDa) e avaliar as diferenças na capacidade quelante de ferro dos peptídeos de cada uma dessas frações.

### 5.3. Perfil aminoacídico

A Tabela 1 apresenta a composição de aminoácidos totais das frações dos hidrolisados. De forma geral, as frações apresentaram composição aminoacídica semelhante. Todas as frações apresentaram altos teores de ácido aspártico e ácido glutâmico (8,4-11,3 e 18,4-27,5 g/100 g proteína, respectivamente). De acordo com Lv *et al.* (2009), proteínas com resíduos de ácido glutâmico, aspártico, serina e histidina podem preferencialmente quelar o ferro, pois este se liga a grupos ricos em oxigênio, como o grupo carboxil dos ácidos aspártico e glutâmico, e grupos ricos em nitrogênio, como o anel imidazol da histidina (SILLEN & MARTELL, 1971). Esse fato faz da proteína de soro de leite uma boa matéria-prima para obtenção de peptídeos com capacidade quelante de ferro, considerando-se que o processo de hidrólise favorece a exposição de grupamentos desses aminoácidos para que se liguem ao mineral.

Embora a composição aminoacídica influencie na atividade quelante dos peptídeos, esta também depende de outros fatores, como estrutura do peptídeo, efeitos estéricos e MM (CARRASCO-CASTILLA, HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, JIMÉNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Composição de aminoácidos totais das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados.

Aminoácido	Aminoácidos totais (g/100 g de proteína)*					
	HA<5	HP<5	HF<5	HA>5	HP>5	HF>5
Ác. Aspártico	10,27	10,59	8,43	11,31	10,59	10,97
Ác. Glutâmico	19,66	19,35	27,49	18,87	18,41	21,45
Serina	4,72	4,38	4,36	5,34	5,59	5,53
Glicina	1,56	1,50	1,40	1,55	1,79	1,71
Histidina	1,71	1,66	1,20	1,78	1,78	1,93
Arginina	1,84	2,01	1,77	2,21	2,17	2,19
Treonina	7,26	6,47	7,15	7,65	7,68	8,16
Alanina	4,76	4,50	4,96	3,87	4,21	4,24
Prolina	5,32	5,20	4,98	6,35	5,89	6,63
Tirosina	2,44	1,10	1,76	2,02	1,85	2,46
Valina	4,82	4,70	4,75	4,51	5,16	4,99
Metionina	3,08	3,03	3,00	3,20	3,56	3,05
Cistina	2,17	2,37	1,90	2,15	2,38	2,26
Isoleucina	5,00	5,42	6,28	4,94	4,59	4,76
Leucina	8,99	8,60	8,61	7,70	8,44	8,09
Fenilalanina	2,56	2,43	2,20	2,45	2,44	2,51
Lisina	7,33	7,51	6,08	7,30	6,74	7,56
Triptofano	1,63	1,68	1,25	1,55	1,69	1,36

HA: hidrolisado com alcalase; HP: hidrolisado com pancreatina; HF: hidrolisado com flavourzyme; < 5: fração < 5 kDa; > 5: fração > 5 kDa; \* média de análise realizada em triplicata,

A Tabela 2 apresenta a composição de aminoácidos livres das frações dos hidrolisados. As frações < 5 kDa dos hidrolisados obtidos com as três enzimas apresentaram maior teor de aminoácidos livres que suas respectivas frações > 5 kDa. As frações HP > 5 kDa e HF > 5 kDa também apresentaram teores expressivos de

aminoácidos livres (8,5 e 15,1 g/100 g proteína, respectivamente), corroborando com a hipótese de formação de agregados na hidrólise seguida de ultrafiltração, descrita no item 5.4.

A amostra HF < 5 kDa apresentou o maior teor de aminoácidos livres (32,6 g/100g proteína), o que está de acordo com a especificidade dessa enzima, que apresenta maior atividade de exopeptidases, gerando, além de peptídeos, aminoácidos livres (NCHIENZA, MORAWICKI & GADANG, 2010). A alcalase, por outro lado, tem atividade de endopeptidase (SMYTH & FITZGERALD, 1998), tendo gerado baixo teor de aminoácidos livres nas frações HA < 5 kDa e HA > 5 kDa (1,6 e 1,2 g/100g proteína, respectivamente). A fração HP < 5 kDa apresentou teor intermediário de aminoácidos livres (8,49 g/100g proteína), pois o sistema enzimático pancreatina apresenta tanto endopeptidases como exopeptidases (YAMAMOTO, 1975), podendo liberar tanto peptídeos pequenos quanto aminoácidos livres, pela ação conjunta de suas enzimas.

Os aminoácidos valina e leucina aparecem em maior concentração em todas as frações, exceto para HP < 5 kDa e HF > 5 kDa, nas quais a lisina é o principal aminoácido livre.

**Tabela 2.** Composição de aminoácidos livres das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados.

Aminoácido	Aminoácidos livres (g/100g de proteína)*					
	HA<5	HP<5	HF<5	HA>5	HP>5	HF>5
Ác. Aspártico	0,01	0,17	1,21	0,01	0,24	0,10
Ác. Glutâmico	0,05	0,13	1,09	0,04	0,22	0,16
Serina	0,01	0,20	1,51	0,01	0,37	0,12
Glicina	0,00	0,08	0,16	0,00	0,00	0,05
Histidina	0,01	0,17	0,32	0,01	0,09	0,10
Arginina	0,01	1,85	1,32	0,00	0,57	1,22
Treonina	0,02	0,27	1,62	0,01	0,37	0,15
Alanina	0,13	0,43	2,91	0,06	0,67	0,23
Prolina	0,03	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
Tirosina	0,08	2,36	1,82	0,27	0,50	1,43
Valina	0,39	3,52	7,49	0,19	1,82	2,26
Metionina	0,03	0,34	0,90	0,03	0,20	0,20
Cistina	0,31	0,32	0,00	0,22	0,00	0,15
Isoleucina	0,05	1,34	3,22	0,01	0,80	1,09
Leucina	0,28	3,53	4,82	0,17	1,17	2,22
Fenilalanina	0,13	1,75	1,47	0,07	0,35	1,05
Lisina	0,04	5,13	2,32	0,07	1,02	4,00
Triptofano	0,10	0,79	0,39	0,02	0,11	0,52
<b>TOTAL</b>	<b>1,65</b>	<b>22,36</b>	<b>32,62</b>	<b>1,20</b>	<b>8,49</b>	<b>15,05</b>

HA: hidrolisado com alcalase; HP: hidrolisado com pancreatina; HF: hidrolisado com flavourzyme; < 5: fração < 5 kDa; > 5: fração > 5 kDa; \* média de análise realizada em triplicata.

Como o teor de aminoácidos livres foi diferente para as frações dos hidrolisados com as três enzimas, foram refeitos os cálculos de GH, corrigindo-os agora com a subtração do teor dos aminoácidos livres ( $\Sigma$ meq de aminoácidos livres/g proteína). O GH

corrigido desta forma foi utilizado para o cálculo do comprimento médio dos peptídeos nas frações. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Teor de grupos amino livres (meq NH<sub>2</sub>/g proteína), grau de hidrólise (GH), Σmeq aminoácidos livres/ g proteína, GH corrigido e comprimento médio da cadeia peptídica (CCP) das frações < 5 kDa e > 5 kDa dos hidrolisados.

Amostra	Grupos amino livres (meq NH <sub>2</sub> / g proteína) <sup>1</sup>	GH (%) <sup>2</sup>	Σmeq aminoácidos livres/ g proteína	GH corrigido (%) <sup>3</sup>	CCP <sup>4</sup>
HA<5 kDa	2,28±0,06 <sup>c</sup>	21,4	0,12	20,0	5,0
HP<5 kDa	3,16±0,60 <sup>b</sup>	29,7	1,92	9,5	10,5
HF<5 kDa	4,83±0,17 <sup>a</sup>	50,5	2,73	19,3	5,2
HA>5 kDa	1,69±0,03 <sup>d</sup>	14,7	0,08	13,8	7,2
HP>5 kDa	2,39±0,19 <sup>c</sup>	22,5	0,72	14,4	6,9
HF>5 kDa	1,78±0,04 <sup>d</sup>	15,7	1,33	0,6	166,7

HA: hidrolisado com alcalase; HP: hidrolisado com pancreatina; HF: hidrolisado com flavourzyme. Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente (p<0,05)

<sup>1</sup>análise realizada em triplicata; <sup>2</sup>determinado pelo método OPA; <sup>3</sup>GH (%) corrigido: valor de grau de hidrólise corrigido pela subtração do teor de aminoácidos livres (Σmeq de aminoácidos livres/g proteína); <sup>4</sup>comprimento médio da cadeia peptídica (número de resíduos de aminoácidos por peptídeo) = 100/GH corrigido (%)

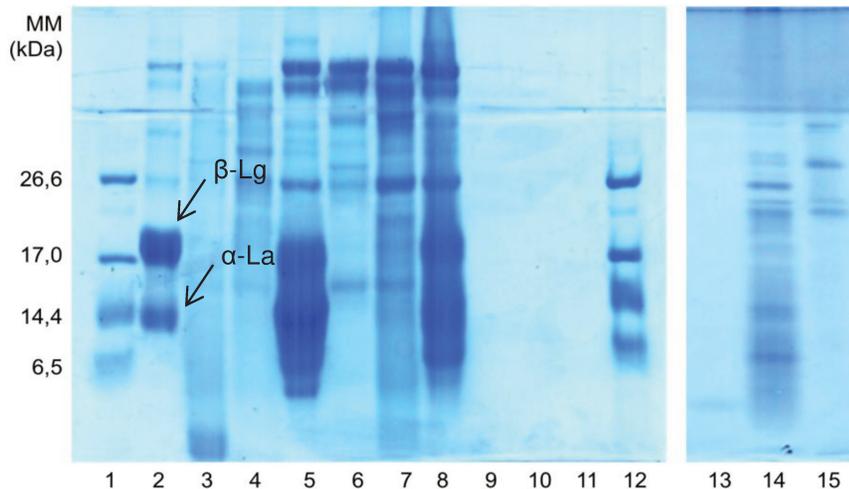
Σmeq NH<sub>2</sub>/g proteína: calculado com base no equivalente de NH<sub>2</sub> de cada aminoácido.

Dentre as frações < 5 kDa, a obtida do HF apresentou maior teor de grupos amino livres, 4,83 meq NH<sub>2</sub>/g proteína, seguida das amostras HP < 5 kDa e HA < 5 kDa. No entanto, para HF < 5 kDa e HP < 5 kDa, de 50 a 60% dos grupos amino livres foram provenientes dos aminoácidos livres, enquanto para HA < 5 kDa esta porcentagem foi de apenas 5%, devido a esta enzima ter atividade apenas de endopeptidase.

Nas frações > 5 kDa, os peptídeos de menor comprimento médio foram obtidos com as enzimas alcalase e pancreatina, sendo o valor de GH corrigido nessas frações, cerca de 25 vezes maior do que o de HF > 5 kDa, o que está de acordo com a atividade de exopeptidase dessa enzima.

#### 5.4. Perfil eletroforético

Os perfis eletroforéticos (SDS-PAGE-Tricina) dos hidrolisados e suas frações > 5 kDa e < 5 kDa estão apresentados na Figura 6. O perfil eletroforético do IPS apresenta bandas com aproximadamente 14 e 18 kDa, correspondentes às proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, respectivamente. Nos perfis dos hidrolisados HA e HP (Figura 6 - colunas 3 e 4, respectivamente) observa-se o desaparecimento dessas bandas em relação ao IPS íntegro, indicando que as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg foram hidrolisadas e, conseqüentemente, ocorreu o aparecimento de bandas de MM menor.



**Figura 6.** Eletroforese (SDS-PAGE/Tricina em meio redutor) dos hidrolisados e suas respectivas frações. Gel de separação 16% T, 3% C com 6 mol/L ureia. (1 e 12) padrão de massa molecular; (2) isolado proteico de soro de leite (IPS); (3) hidrolisado com alcalase (HA); (4) hidrolisado com pancreatina (HP); (5) hidrolisado com flavourzyme (HF); (6) HA > 5 kDa; (7) HP > 5 kDa; (8) HF > 5 kDa; (9) HA < 5 kDa; (10) HP < 5 kDa; (11) HF < 5 kDa; (13) enzima alcalase; (14) enzima pancreatina; (15) enzima flavourzyme.

O perfil do hidrolisado HF (Figura 6 – coluna 5) mostra bandas intensas na região de aproximadamente 6 a 19 kDa, abrangendo as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg não hidrolisadas e/ou produtos de hidrólise dessas e outras proteínas. O perfil indica que a flavourzyme originou peptídeos de MM maior do que as demais, o que está de acordo com o menor GH obtido com esta enzima (9,1%). O perfil das frações > 5 kDa apresentou a maioria das bandas coincidentes com o perfil dos seus respectivos hidrolisados. Algumas das bandas

dos perfis dos hidrolisados são referentes às enzimas utilizadas na hidrólise, as quais podem ser confirmadas nos perfis delas. A ausência dessas bandas nas frações < 5 kDa sugere que as enzimas ficaram retidas na membrana de ultrafiltração.

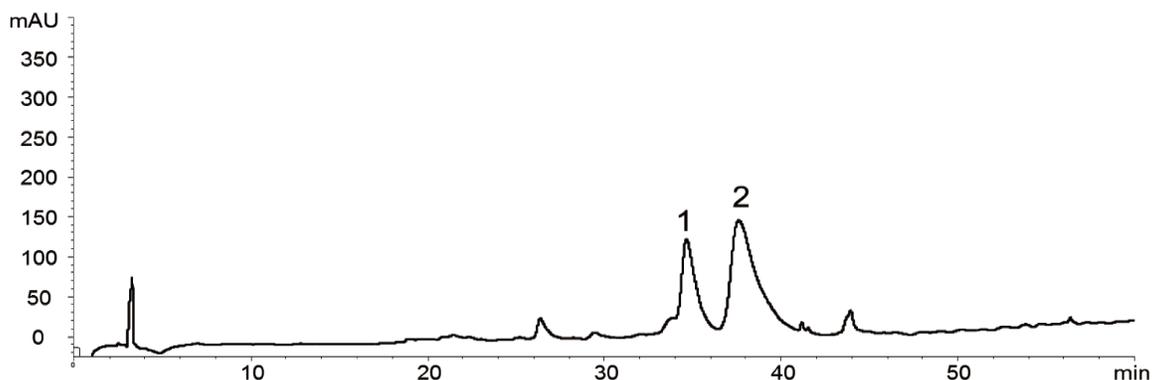
As frações < 5 kDa de todos os hidrolisados não apresentaram nenhuma banda, embora quantidades crescentes dessas amostras tenham sido aplicadas no gel. Isso pode ser devido à presença apenas de peptídeos pequenos (< 3 kDa) que podem não ter sido corados, por haver perda destes durante a fixação e/ou coloração do gel (SCHÄGGER & VON JAGOW, 1987; CLAEYS, DE SMET, BALCAEN *et al.*, 2004).

O perfil eletroforético das frações > 5 kDa dos hidrolisados (retidas na ultrafiltração) mostra a presença de bandas na parte inferior do gel, sugerindo a presença de peptídeos de MM inferior à 6,5 kDa. A presença de peptídeos com MM possivelmente menor que o corte da membrana utilizada na separação pode ser explicada por interações entre peptídeos, promovendo a formação de agregados (DOUCET, GAUTHIER & FOEGEDING, 2001) e, dessa forma, não permitindo a passagem pela membrana. O pH próximo ao neutro, utilizado nesta etapa, pode resultar em menor passagem de proteína pela membrana se comparado ao pH ao redor de 3,0 (HUISMAN, PRÁDANOS & HERNÁNDEZ, 2000). Em pH de 6,0 a 8,0, faixa de pH dos hidrolisados no processo de ultrafiltração, a repulsão eletrostática é menor do que em pH 3,0, por exemplo, no qual a presença de cargas positivas em praticamente todos os grupos funcionais favorece a repulsão. (NOISEUX, GAUTHIER & TURGEON, 2002). Otte *et al.* (2000) observaram formação de agregados na hidrólise de  $\beta$ -Lg, em pH 7,8.

### **5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)**

As proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg isoladas foram utilizadas como padrões e seus tempos de retenção (TR) foram 37,8 e 40,6 min, respectivamente. A Figura 7 apresenta o perfil cromatográfico (CLAE-FR) do IPS, obtido sob as mesmas condições dos padrões. O perfil

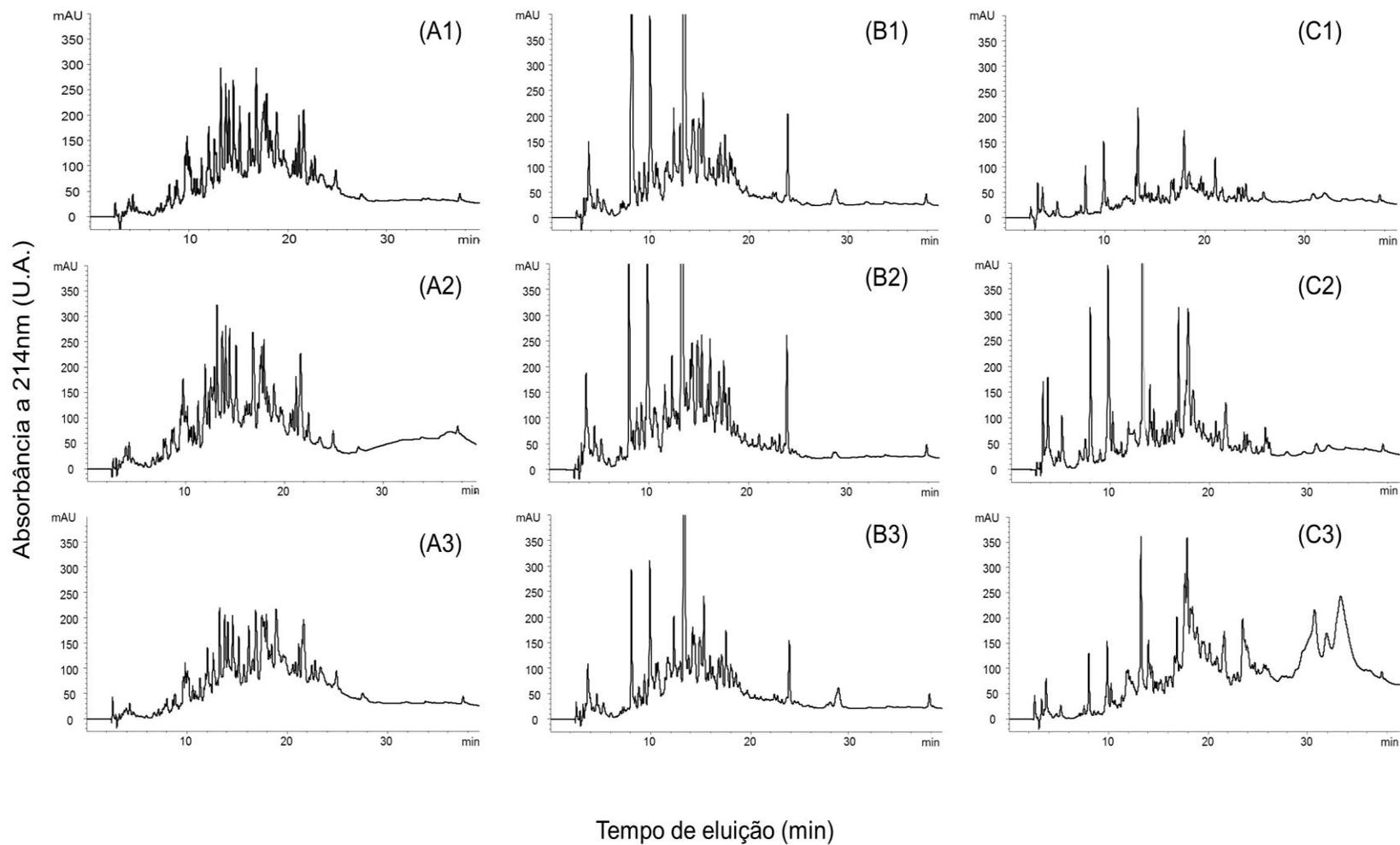
mostra dois picos correspondentes às proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, respectivamente, identificadas pelos tempos de retenção, próximos aos obtidos para os padrões.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico (CLAE-FR) do isolado proteico de soro de leite (IPS). Coluna  $C_{18}$  (4,6 mm x 250 mm; partícula de 5  $\mu$ m); fluxo de 1 mL/min. (1)  $\alpha$ -La (TR = 35,1 min); (2)  $\beta$ -Lg (TR = 37,9 min). TR = tempo de retenção.

Na Figura 8 estão apresentados os cromatogramas dos hidrolisados com as enzimas alcalase, pancreatina e flavourzyme e de suas respectivas frações < 5 kDa e > 5 kDa, nos quais pode-se verificar a ausência dos picos referentes às proteínas do IPS (Figura 7), indicando a hidrólise destas em fragmentos menores. O tempo de eluição dos peptídeos varia conforme a polaridade da fase móvel: os peptídeos mais hidrofílicos são eluídos nos primeiros minutos, enquanto os peptídeos menos hidrofílicos são retidos por mais tempo.

Observa-se a presença de picos bastante hidrofílicos, com TR inferior a 20 min, nas frações > 5 kDa, igualmente presentes nos perfis de seus respectivos hidrolisados, o que sugere a existência de peptídeos de baixa MM nessas frações, também observados nos perfis eletroforéticos (Figura 6).



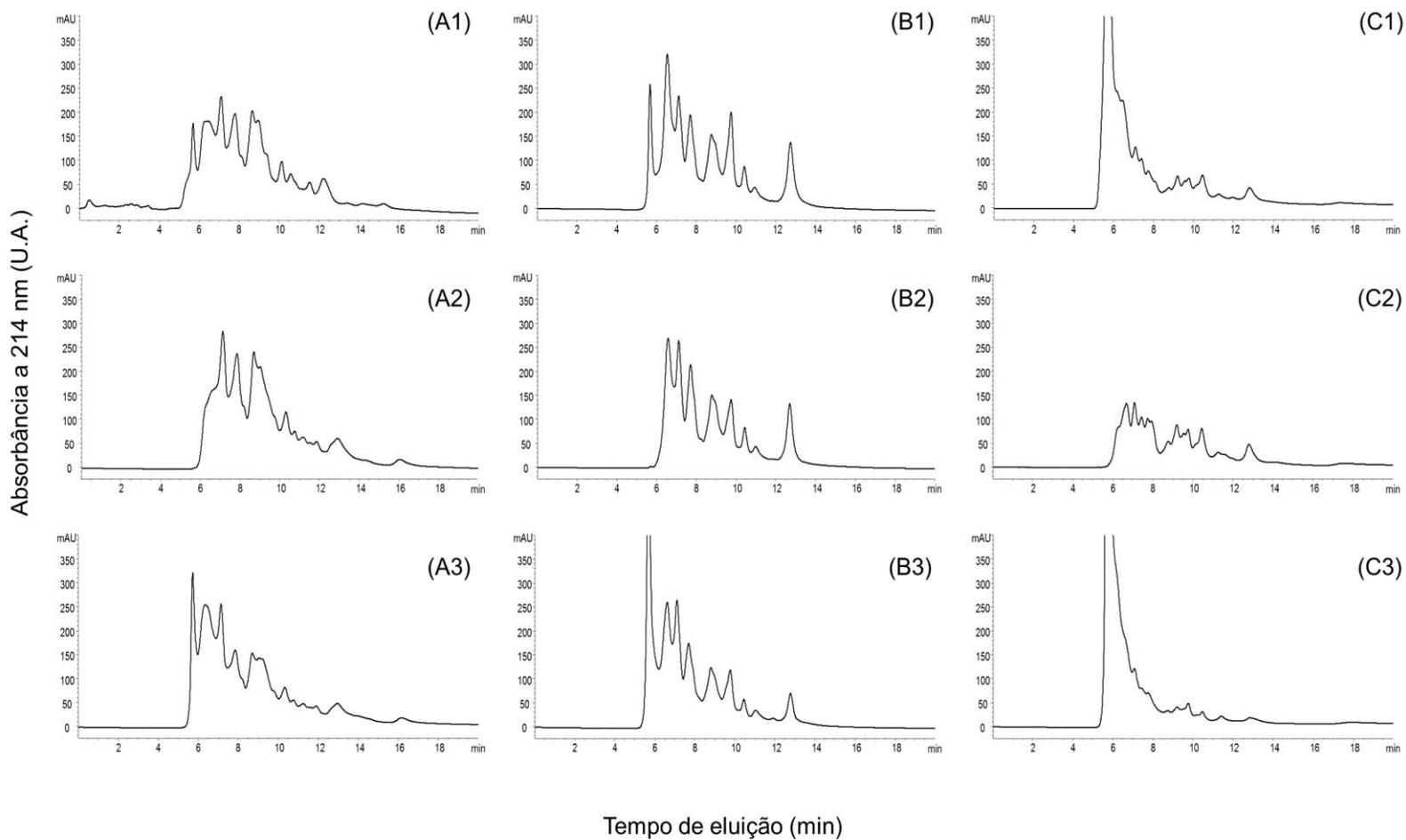
**Figura 8.** Perfil cromatográfico (CLAE-FR) dos hidrolisados com alcalase, pancreatina e flavourzyme e suas respectivas frações. (A) alcalase, (B) pancreatina, (C) flavourzyme, (1) hidrolisados, (2) frações < 5 kDa, (3) frações > 5 kDa. Condições de análise: coluna C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, partícula 5 µm); fluxo de 1 mL/min.

O sistema enzimático pancreatina originou maior número de fragmentos com TR inferior a 10 min e, portanto, mais hidrofílicos do que os obtidos com alcalase. O hidrolisado com flavourzyme (Figura 8 C1) não apresentou completa solubilidade em 0,04% TFA, desse modo, o cromatograma obtido corresponde apenas à fração solubilizada. A fração HF > 5 kDa (Figura 8 C3) apresenta picos com TR superior a 30 min, não observados nos demais cromatogramas, indicando perfil menos hidrofílico em comparação às frações dos hidrolisados com alcalase e pancreatina. Possivelmente, esses picos correspondam a fragmentos maiores e mais hidrofóbicos liberados por essa enzima. No perfil eletroforético dessa amostra (Figura 6 – coluna 8) também foram observadas bandas intensas na região de MM superior à maioria dos fragmentos liberados pelas demais enzimas.

#### **5.6. Cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (CLAE-EM)**

A  $\alpha$ -La (14,4 kDa) e a BSA (66 kDa) foram utilizadas como padrões para avaliar a distribuição de MM das amostras por cromatografia de exclusão molecular. A MM da BSA (66 kDa) é superior à faixa de separação da coluna (1-20 kDa) e, assim, o TR dessa proteína, 5,7 min, representa o volume morto. O TR da  $\alpha$ -La (14,4 kDa) foi 8,9 min. Os cromatogramas dos hidrolisados e suas respectivas frações encontram-se na Figura 9.

De forma geral, os hidrolisados e suas frações > 5 kDa apresentaram picos indicando maior MM aparente do que as apresentadas pelas frações < 5 kDa. As frações < 5 kDa apresentaram picos de MM superior a 14,4 kDa, acima das MM reais obtidas por eletroforese. Esses resultados sugerem que agregados com MM maior são formados em pH em torno do neutro, fazendo com que ocorra eluição conjunta de peptídeos de diferentes massas moleculares. Na eletroforese, a identificação de peptídeos de menor MM nas frações > 5 kDa foi possível devido às condições desnaturantes e redutoras, obtendo-se, então, a MM real das cadeias peptídicas (SCHAGGER, 2006).



**Figura 9.** Perfil cromatográfico (CLAE-EM) dos hidrolisados com alcalase, pancreatina e flavourzyme e suas respectivas frações. (A) alcalase, (B) pancreatina, (C) flavourzyme, (1) hidrolisados, (2) frações < 5 kDa, (3) frações > 5 kDa. Condições de análise: coluna Protein-Pak™ 60Å (7,8 mm x 300 mm), fluxo de 1 mL/min, FM: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,8.

### 5.7. Avaliação do potencial de quelação das frações dos hidrolisados

O pH utilizado na reação de quelação foi 7,0 pois a ligação de coordenação entre peptídeo e metal é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos do peptídeo ou proteína estão parcial ou totalmente desprotonados, ou seja, quando estão em condição na qual o valor de pH é igual ou superior ao do pKa dos grupos ionizáveis (PORATH, 1990). Dentre os principais sítios de ligação com o ferro, destacam-se as cadeias laterais dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico, pK  $\alpha$ -COOH ácido glutâmico = 4,25; pK  $\beta$ -COOH ácido aspártico = 3,86 (FARFÁN, 1990), e em menor extensão as ligações peptídicas (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002; HUANG, REN & JIANG, 2011). Outros autores utilizaram o mesmo pH em estudos da capacidade quelante de ferro de peptídeos (LEE & SONG, 2009; SUGIARTO, YE & SINGH, 2009; HUANG, REN & JIANG, 2011; ZHOU, WANG, AI *et al.*, 2012).

A Tabela 4 apresenta a porcentagem de ferro solúvel no sobrenadante após a reação de quelação (sobrenadante 1), em relação ao ferro inicialmente adicionado. Ensaios controle sem adição de FeCl<sub>2</sub> foram realizados nas mesmas condições a fim de observar o comportamento dos peptídeos nas condições da análise. Dessa forma, foi possível avaliar a influência da presença do ferro no comportamento dos peptídeos em solução. Para todos os hidrolisados utilizados tanto no ensaio controle sem FeCl<sub>2</sub> quanto na reação de quelação com ferro, foi observado que, em pH 7,0, não houve variação ( $p < 0,05$ ) entre o teor de nitrogênio solúvel somente com hidrolisado (97,3-100%) e na presença de FeCl<sub>2</sub> (94,4-100%), em relação ao inicialmente adicionado para a reação.

Com as frações > 5 kDa dos hidrolisados obtiveram-se teores de ferro solúvel em pH 7,0 (58,3-70,6%) superiores aos obtidos com as frações < 5 kDa (37,4-51,5%). A fração HP > 5 kDa manteve o maior teor de ferro em solução (70,6%). No ensaio controle realizado apenas com FeCl<sub>2</sub>, o sobrenadante apresentou teor inferior a 0,5% em relação ao inicialmente presente em solução, comprovando a insolubilidade do sal em pH 7,0. Considerando-se que os íons Fe<sup>2+</sup> se tornam insolúveis em pH superior a 3 a menos que

estejam ligados a um composto solúvel (YU, HUANG & CHIOU, 2000), como parte do ferro foi mantido em solução nas análises com as amostras, sugere-se uma interação ferro-peptídeo. Essa interação impede o metal de se ligar à água, diminuindo assim a formação de hidróxidos férricos e aumentando a solubilidade e biodisponibilidade do ferro (ZHU, GLAHN, NELSON *et al.*, 2009).

**Tabela 4.** Teor de ferro no sobrenadante das amostras após reação de quelação em pH 7,0 e teor de ferro precipitado em pH 3,5.

Amostra	% Fe solúvel em	% Fe precipitado
	pH 7,0 <sup>1</sup>	em pH 3,5 <sup>2</sup>
HA < 5 kDa	37,4±1,0 <sup>f</sup>	13,9±0,7 <sup>f</sup>
HP < 5 kDa	51,5±2,0 <sup>d</sup>	39,9±0,7 <sup>c</sup>
HF < 5 kDa	47,4±1,3 <sup>e</sup>	18,2±0,3 <sup>e</sup>
HA > 5 kDa	58,3±3,0 <sup>c</sup>	45,1±0,6 <sup>b</sup>
HP > 5 kDa	70,6±1,5 <sup>a</sup>	65,3±0,7 <sup>a</sup>
HF > 5 kDa	66,1±0,9 <sup>b</sup>	34,9±0,2 <sup>d</sup>

HA: hidrolisado com alcalase; HP: hidrolisado com pancreatina; HF: hidrolisado com flavourzyme. Amostras com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>em relação ao adicionado para reação de quelação: 400 mg proteína e 10 mg Fe em 10 mL; média de 6 determinações; <sup>2</sup>determinado por diferença: Fe precipitado em pH 3,5 = Fe sobrenadante 1 – Fe sobrenadante 2; média de 6 determinações.

Para avaliar se o ferro solúvel em pH 7,0 está realmente complexado ou apenas fracamente ligado aos peptídeos, os sobrenadantes da reação de quelação (sobrenadante 1) foram ajustados para pH 3,5. Após centrifugação, o ferro no sobrenadante (sobrenadante 2) foi considerado livre e o ferro precipitado, considerado quelado (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002). As frações > 5 kDa apresentaram maior capacidade de reter o ferro em solução em pH 7,0 bem como maior teor de ferro precipitado em pH 3,5.

Dentre as frações > 5 kDa, a do hidrolisado com pancreatina (HP > 5 kDa) apresentou o maior teor de ferro precipitado (65,3%) em pH 3,5, o que sugere, segundo Chaud *et al.* (2002), que tenha maior interação com o ferro que estava em solução. Chaud *et al.* (2002), estudando complexo Fe<sup>3+</sup>-peptídeo de hidrolisado de caseína, observaram precipitação de cerca de 90% do ferro em pH 3,5 e total solubilidade em pH 7,0. Franzan (2006) observou a precipitação de complexos Fe<sup>3+</sup>-peptídeo de hidrolisado de proteína de soja do meio reacional, em pH abaixo de 5,0.

Os maiores teores de ferro solúvel em pH 7,0, 70,6%, e de ferro precipitado em pH 3,5, 65,3%, obtidos com a amostra HP > 5 kDa, indicam maior capacidade quelante desta amostra em relação às demais. Dessa forma, essa amostra foi selecionada para a continuidade do estudo. Analisou-se também a amostra HP < 5 kDa, a fim de avaliar as frações com diferentes faixas de MM obtidas do hidrolisado com a mesma enzima.

### **5.8. Avaliação da estabilidade do quelato às condições gástricas**

Os sobrenadantes liofilizados da reação de quelação (sobrenadante 1) das amostras HP < 5 kDa e HP > 5 kDa foram submetidos à digestão gástrica *in vitro* a fim de se avaliar a estabilidade da ligação Fe<sup>2+</sup>-peptídeo às condições gástricas. Essa avaliação foi baseada nas seguintes premissas: o ferro livre é insolúvel em pH 7,0 e, desse modo, caso o pH estomacal associado à ação da pepsina promova o rompimento da ligação Fe<sup>2+</sup>-peptídeo ou, se o ferro estiver apenas fracamente ligado, o ferro liberado precipita após o ajuste de pH para 7,0. Dessa forma, o ferro foi determinado no digerido gástrico após a neutralização (pH 7,0).

Os teores de ferro nas amostras submetidas às condições gástricas, com e sem adição de pepsina, bem como para os ensaios controle, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Teor de ferro solúvel em pH 7,0 após digestão gástrica *in vitro*.

Ensaio		Teor de ferro solúvel (%)* (em pH 7,0; após digestão gástrica <i>in vitro</i> )
Controle Fe	sem pepsina	1,5±0,6 <sup>d</sup>
	com pepsina	9,9±1,8 <sup>c</sup>
HP > 5 kDa	sem pepsina	59,0±3,3 <sup>a</sup>
	com pepsina	57,7±7,8 <sup>a</sup>
HP < 5 kDa	sem pepsina	43,0±8,7 <sup>b</sup>
	com pepsina	40,1±6,5 <sup>b</sup>

HP: hidrolisado com pancreatina; amostras com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

\*em relação ao inicial adicionado para a realização da digestão: 50-60 µg Fe/mL para as amostras, provenientes do sobrenadante 1 liofilizado, e 100 µg Fe/mL para o ensaio controle do ferro. Média de 6 determinações.

A baixa solubilidade do ferro, 1,5%, no ensaio controle realizado apenas com o  $\text{FeCl}_2$  sem adição de enzima, comprovou a sua insolubilidade em pH 7,0. Quando o ensaio foi realizado com adição de pepsina, o teor de ferro solúvel em pH 7,0 aumentou (9,9%), indicando solubilização parcial do ferro, possivelmente pela interação do ferro com grupos funcionais disponíveis na cadeia peptídica da enzima, de forma semelhante à que ocorre com os peptídeos dos hidrolisados. No entanto, quando a análise foi feita com as frações do hidrolisado, observou-se capacidade desses peptídeos em manter o ferro solúvel em pH 7,0 de 4 a 6 vezes maior (40,1 a 59,0%). A ação foi igualmente efetiva com ou sem a utilização da pepsina. Esses resultados sugerem que a ligação formada entre os peptídeos e o ferro na reação de quelação é relativamente estável às condições gástricas.

Porém, como apenas parte do ferro inicialmente solúvel em pH 7,0 foi ressolubilizado, sugere-se que as condições gástricas podem ter favorecido a separação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  fracamente ligados aos peptídeos. Dessa forma, quando o pH foi elevado para 7,0, o ferro tornou-se insolúvel, separando-se com a centrifugação. Esse resultado sugere que a permanência do ferro em solução após reação de quelação (sobrenadante

1) possa ser devida não só às ligações coordenadas de peptídeos com o metal, mas também às ligações mais fracas que, apesar de manterem o ferro em solução, não caracterizam a formação de um quelato.

Dessa forma, a avaliação da diferença de solubilidade do ferro em pH 7,0, antes e após a simulação da digestão gástrica, sugere que mais de 40% do ferro está quelado, o que diminui a formação de hidróxidos insolúveis e potencialmente eleva sua biodisponibilidade (ZHU, GLAHN, NELSON *et al.*, 2009). A proteção do ferro pela quelação é importante, pois o  $Fe^{2+}$  livre tem sido apontado na literatura como agente causador de danos à mucosa gastrintestinal (SLIVKA, KANG & COHEN, 1986), e de distúrbios inflamatórios (LIH-BRODY, POWELL, COLLIER *et al.*, 1996). A quelação também pode impedir a participação do ferro em reações pró-oxidantes, possivelmente prevenindo os efeitos colaterais ocasionados pelo ferro livre, como azia, dor abdominal, náusea e diarreia (MIMURA, BREGANÓ, DICHI *et al.*, 2008). Além disso, a solubilidade de complexos Fe-peptídeo parece ser de grande importância para a absorção e biodisponibilidade *in vivo*, tanto do mineral quanto dos peptídeos (SANYAL, HIRSCH & MOORE, 1992; SWAISGOOD, 1992).

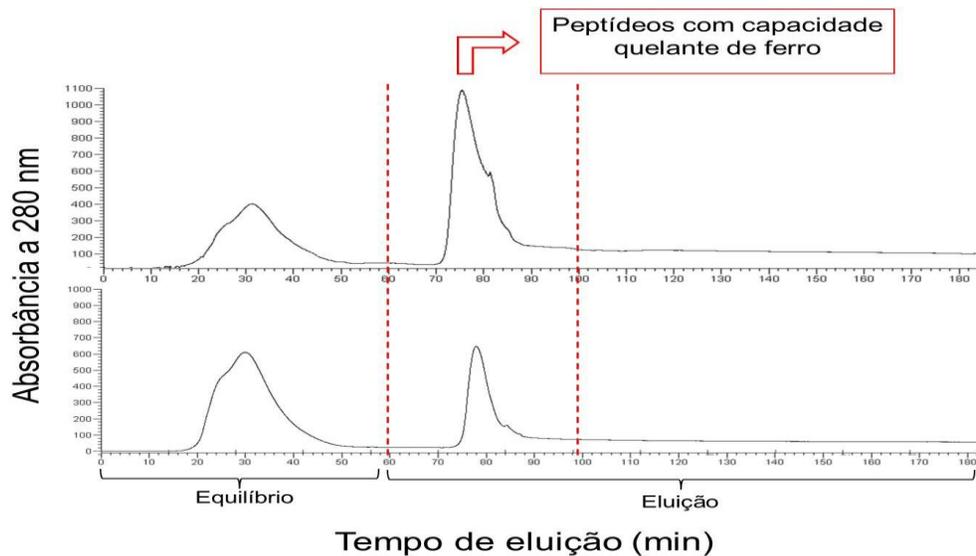
### **5.9. Isolamento dos peptídeos por coluna de afinidade IMAC- $Fe^{3+}$**

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC- $Fe^{3+}$ ) foi utilizada para a separação dos peptídeos das frações HP < 5 kDa e HP > 5 kDa, previamente selecionadas para prosseguir o estudo. Os cromatogramas dessas amostras encontram-se na Figura 10.

Os peptídeos eluídos no segundo pico, entre 70 e 90 min, são os que apresentam capacidade quelante de ferro, pois ficaram retidos na coluna durante o equilíbrio com tampão acetato (pH 5,5). A amostra HP > 5 kDa apresentou pico mais intenso do que a HP < 5 kDa, indicando maior concentração de peptídeos com capacidade ligante ao ferro.

Lv *et al.* (2009) observaram que a fração de MM entre 10-30 kDa de hidrolisados de soja apresentou maior capacidade de ligação ao ferro em IMAC, em relação às de menor MM.

A eluição se dá quando a fase móvel é alterada para solução fosfato de sódio (LV, LIU, BAO *et al.*, 2009), capaz de liberar os peptídeos retidos na coluna por apresentar maior afinidade pelo sítio de ligação (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009).



**Figura 10.** Perfil cromatográfico (IMAC-Fe<sup>3+</sup>) das amostras HP > 5 kDa e HP < 5 kDa. (A) fração > 5 kDa do hidrolisado com pancreatina (HP > 5 kDa); (B) fração < 5 kDa do hidrolisado com pancreatina (HP < 5 kDa). Condições de análise: resina IDA-Sepharose 6B; fluxo de 1 mL/min; monitoramento a 280 nm; equilíbrio: tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 5,5 com 0,1 mol/L NaCl / eluição: solução fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L.

A análise foi realizada com monitoramento a 280 nm e, portanto, a intensidade dos picos (Figura 10) pode não corresponder ao total de peptídeos das amostras, pois nesse comprimento de onda somente proteínas ou peptídeos com resíduos dos aminoácidos aromáticos são detectáveis (STOSCHECK, 1990). Para avaliação do percentual de peptídeos com capacidade ligante ao ferro em cada amostra, foi feita a determinação do teor proteico nas frações coletadas pelo método BCA.

A Tabela 6 apresenta a porcentagem de peptídeos com e sem capacidade ligante, calculada considerando-se como 100% a soma da massa de proteína em todas as

frações coletadas. Embora a somatória do teor de proteína nas frações para cada amostra tenha sido inferior à massa de proteína na corrida cromatográfica, 100 mg (valor obtido pelo método de Kjeldahl), os teores de proteína obtidos pelo método BCA (Tabela 6) indicam que a amostra HP > 5 kDa apresentou maior teor de peptídeos com capacidade quelante em relação à amostra HP < 5 kDa, resultado semelhante ao obtido pela análise IMAC. O método BCA quantifica peptídeos e proteínas em solução com no mínimo três aminoácidos, isto é, duas ligações peptídicas (FONKWE & SINGH, 1996). Portanto, dipeptídeos e aminoácidos livres, possivelmente presentes nas amostras, não foram detectados por esse método, o que pode ter subestimado o teor de proteína real das amostras.

**Tabela 6.** Teor de proteína nas frações coletadas em IMAC-Fe<sup>3+</sup>.

Amostra	Σ proteína frações <sup>1</sup>		
	mg <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	
HP > 5 kDa	Peptídeos não quelantes	12,06	38,0%
	Peptídeos quelantes	19,64	62,0%
HP < 5 kDa	Peptídeos não quelantes	14,52	66,1%
	Peptídeos quelantes	7,45	33,9%

HP: hidrolisado com pancreatina. Peptídeos não quelantes: eluídos com tampão de equilíbrio em IMAC (primeiro pico); peptídeos quelantes: eluídos com tampão de eluição em IMAC (segundo pico).

<sup>1</sup>determinado pelo método BCA; <sup>2</sup>massa de proteína em relação à soma dos valores encontrados em todas as frações eluídas da mesma amostra; <sup>3</sup>porcentagem de proteína em relação à massa total.

O resultado está de acordo com o obtido na avaliação da capacidade quelante pela reação com ferro, na qual a amostra HP > 5 kDa apresentou maior capacidade de manter o ferro em solução, evidenciando uma maior interação com o metal.

#### **5.10. Sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas**

As frações com afinidade de ligação com o ferro, coletadas por IMAC (HPq > 5 kDa e HPq < 5 kDa) foram analisadas por espectrometria de massas para identificação dos peptídeos. A Tabela 7 apresenta os fragmentos identificados, bem como a proteína precursora de cada fragmento e sua sequência completa.

Dos 34 fragmentos identificados, 28 são oriundos da estrutura da  $\beta$ -Lg; apenas 2 fragmentos da  $\alpha$ -La e da BSA foram identificados em cada uma das amostras, sendo que nenhum fragmento de BSA foi identificado na amostra HPq < 5 kDa.

**Tabela 7.** Fragmentos identificados nas amostras HPq > 5 kDa e HPq < 5 kDa, proteínas precursoras e sequência completa das mesmas.

Proteína precursora	Sequência completa da proteína precursora							
	LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRV <b>YVEELKPTPEGDLEILLQKWENDECAQKKIIAEKTKIPA</b> VFKIDALNENKVL <b>VLDTDYK</b> KYLLFCMENSAPPEQSLVCQCL <b>VRTPEVDDEALEKFDK</b> ALKALPMHIRLSFNPTQLEE QCHI							
	Peptídeos identificados							
	HPq > 5 kDa				HPq < 5 kDa			
	Nº	Sequência	m/z	Carga	Nº	Sequência	m/z	Carga
<b>β-lactoglobulina</b>	1	<b>TPEVDDE</b>	804,3	+1	1	<b>TPEVDDE</b>	804,3	+1
	2	<b>VEELKPTPE</b>	521,3	+2	2	<b>VEELKPTPE</b>	521,3	+2
	3	<b>VEELKPT</b>	408,2	+2	3	<b>EVDDEALEK</b>	524,2	+2
	4	<b>YVEELKPTPE</b>	602,8	+2	4	<b>PEVDDEALEK</b>	572,7	+2
	5	<b>TPEVDDEALEK</b>	623,2	+2	5	<b>TPEVDDEALEK</b>	623,3	+2
	6	<b>VLDTDYK</b>	427,2	+2	6	<b>EELKPTPEGDLE</b>	678,8	+2
	7	<b>VRTPEVDDE</b>	530,2	+2	7	<b>TPEVDDEALEKF</b>	696,8	+2
	8	<b>VEELKPTPEGDLEI</b>	784,9	+2	8	<b>RTPEVDDEALEK</b>	701,3	+2
					9	<b>EVDDEALEKFDK</b>	719,3	+2
					10	<b>VEELKPTPEGDLE</b>	728,3	+2
					11	<b>TPEVDDEALEKFD</b>	754,3	+2
					12	<b>PEVDDEALEKFDK</b>	512,2	+3
					13	<b>VEELKPTPEGDLEI</b>	784,8	+2
					14	<b>EELKPTPEGDLEIL</b>	791,9	+2
					15	<b>YVEELKPTPEGDLE</b>	809,9	+2
					16	<b>TPEVDDEALEKFDK</b>	545,9	+3
					17	<b>VEELKPTPEGDLEIL</b>	784,9	+2
					18	<b>YVEELKPTPEGDLE</b>	859,4	+2
					19	<b>YVEELKPTPEGDLEI</b>	866,4	+2
					20	<b>YVEELKPTPEGDLEIL</b>	922,9	+2
	Sequência completa da proteína precursora							
	EQLTKCEVFLRELKDLKGYGGVSLPEWVCTAFHTSGYDTQAIQVQNDSTHEYGLFQINNKIW <b>CKDDQNPH</b> SSSNICNISC D <b>KFLDDDLTDDIM</b> CVKKILDKVGINYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL							
	Peptídeos identificados							
	HPq > 5 kDa				HPq < 5 kDa			
	Nº	Sequência	m/z	Carga	Nº	Sequência	m/z	Carga
<b>α-lactoalbumina</b>	9	<b>DDDLTDDI</b>	921,4	+1	21	<b>FLDDDLTDDIM</b>	656,8	+2
	10	<b>CKDDQNPH</b>	478,7	+2	22	<b>KFLDDDLTDDIM</b>	720,8	+2
	Sequência completa da proteína precursora							
	DTHKSEIAHR <b>FKDLGEEH</b> FKGLVLIAFSQYLQCCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVA SLRETYGDMADCCKEQPERNECFLSH <b>KDDSPDLPK</b> LKPDNTLCDEFKADEKKFWGKLYEYIARRHPYFYAPELL YANKYNGVFQECCQAADKGACLLPKIETMREKVLTSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTK LVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICBBZBTISSKLECKDPCLEKSHCIAEVEKDAIPEDLPLTADFAEDK DVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCAKDDPHACYTSVFDKHLKHLVDEPQNLIKZB CBZFEKLGEXXALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVE SKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQATALVELLKHKPKATEEQLKTVME NFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA							
	Peptídeos identificados							
	HPq > 5 kDa				HPq < 5 kDa			
	Nº	Sequência	m/z	Carga	Nº	Sequência	m/z	Carga
<b>BSA (albumina de soro bovina)</b>	11	<b>FKDLGEEH</b>	487,7	+2	-	-	-	-
	12	<b>KDDSPDLPK</b>	507,7	+2	-	-	-	-

HPq >: fração coletada em IMAC referente aos peptídeos com capacidade quelante (segundo pico) da amostra > 5 kDa do hidrolisado com pancreatina; HPq <: fração coletada em IMAC referente aos peptídeos com capacidade quelante (segundo pico) da amostra < 5 kDa do hidrolisado com pancreatina. Sequências destacadas em vermelho correspondem a peptídeos da fração HPq > 5 kDa; em azul, fração HPq < 5 kDa; em roxo, peptídeos identificados nas duas amostras. A = Alanina; C = Cisteína; D = Ácido Aspártico; E = Ácido Glutâmico; F = Fenilalanina; G = Glicina; H = Histidina; I = Isoleucina; K = Lisina; L = Leucina; M = Metionina; N = Asparagina; P = Prolina; Q = Glutamina; R = Arginina; S = Serina; T = Treonina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina. Os números dos fragmentos estão relacionados com seus tempos de retenção na Figura 11.

Considerando todos os fragmentos identificados, verificou-se que apenas três regiões da estrutura da  $\beta$ -Lg e duas regiões da  $\alpha$ -La foram formadoras das sequências identificadas. A maioria dos fragmentos pertence às sequências YVEELKPTPEGDLEIL e RTPEVDDEALEK da  $\beta$ -Lg e DDDLTTDDI da  $\alpha$ -La. Na estrutura da BSA, duas regiões distintas originaram os dois fragmentos identificados na fração HPq > 5 kDa, FKDLGEEH e KDDSPDLPK.

Mais de 80% dos fragmentos identificados apresentaram ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) e, em sua maioria, continham de 2 a 5 resíduos na sequência. Todos os fragmentos identificados continham ao menos um desses dois aminoácidos. Os grupos carboxílicos estão entre os principais sítios de ligação com o ferro (CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002; SOVAGO & OSZ, 2006; LEE & SONG, 2009; HUANG, REN & JIANG, 2011), o que corrobora com o resultado.

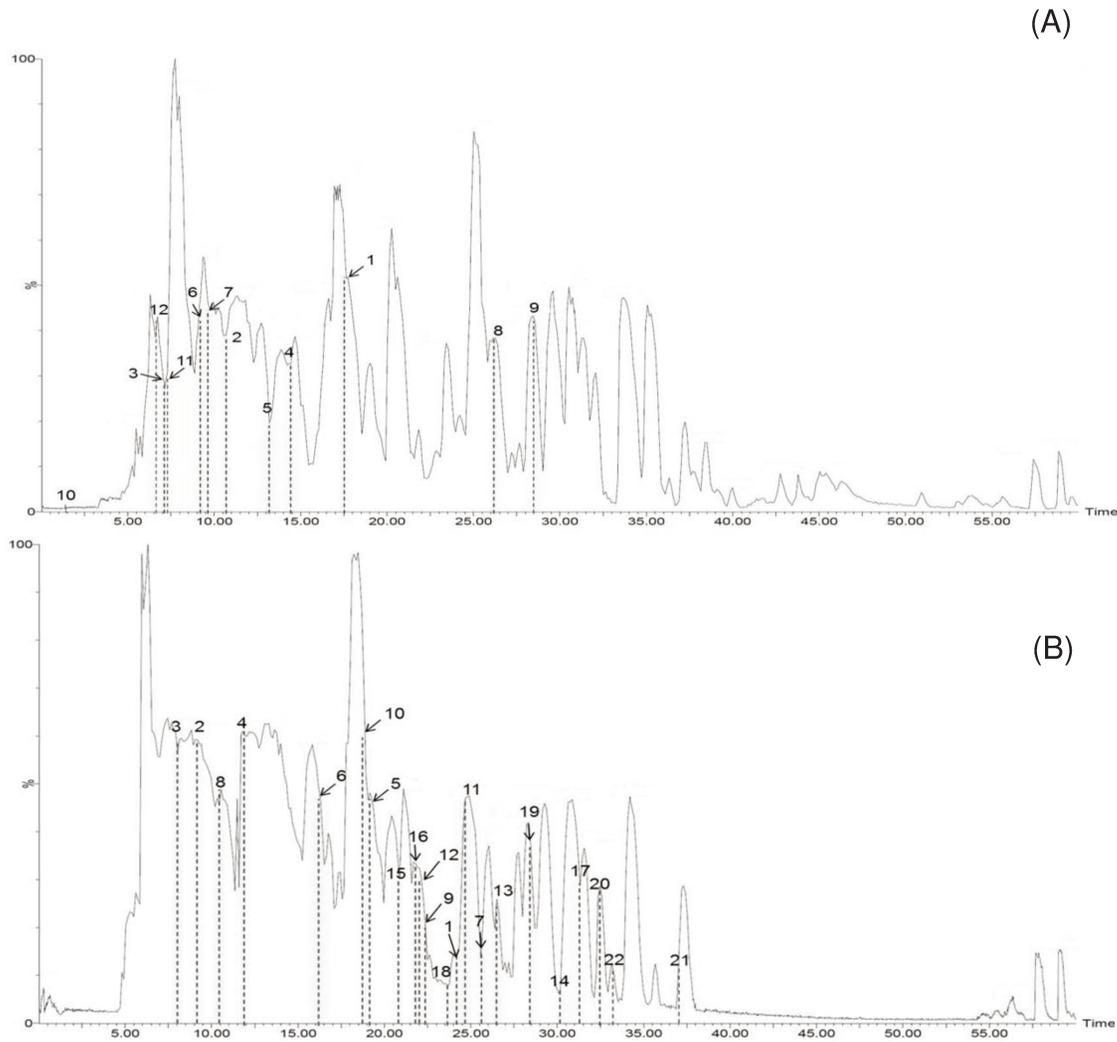
Salienta-se que em pH 5,5, utilizado na separação das frações por IMAC, resíduos de ácido aspártico ou glutâmico apresentam maior capacidade de ligação com o  $\text{Fe}^{3+}$  do que resíduos de histidina (RAMADAN & PORATH, 1985), que também tem importante atividade na quelação de ferro (SWAIN, TABATABAI & REDDY, 2002; HURRELL, REDDY, JUILLERAT *et al.*, 2006; STORCKSDIECK, BONSMANN & HURRELL, 2007; LV, LIU, BAO *et al.*, 2009). Em pH 5,5 os grupos ionizáveis dos aminoácidos ácido aspártico e glutâmico, com pK 3,86 e 4,25, respectivamente (FARFÁN, 1990), apresentam-se desprotonados, o que favorece a ligação com o ferro (BRESOLIN, MIRANDA & BUENO, 2009). Já o anel imizadol da histidina, com pK 6,0 (FARFÁN, 1990), apresenta-se protonado, sendo, portanto, favorecida a interação do ferro com ácido aspártico e glutâmico, em relação ao grupo imidazol da histidina. Destaca-se também que os ácidos aspártico e glutâmico na matéria-prima têm concentração de 6 a 11 vezes superior à da histidina, o que aumenta a probabilidade de interação do ferro com esses grupos.

Resíduos de lisina (K) e leucina (L), que também podem estar envolvidos na ligação com o ferro (REDDY & MAHONEY, 1995; CHAUD, IZUMI, NAHAAL *et al.*, 2002;

TORRES-FUENTES, ALAIZ & VIOQUE, 2012), estão presentes em mais de 80% dos fragmentos identificados. Os resíduos dos aminoácidos prolina (P), treonina (T) e valina (V) estão presentes em mais de 70% e os demais aminoácidos aparecem em menos de 30%.

Como os fragmentos identificados são provenientes da hidrólise das proteínas do soro de leite com o sistema enzimático pancreatina, foi possível observar algumas clivagens características das enzimas nos fragmentos identificados: lisina ou arginina no grupo C-terminal do peptídeo ou à esquerda da clivagem que originou o grupo N-terminal do mesmo, característica da enzima tripsina; presença dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina ou histidina nas extremidades dos fragmentos, característica da enzima quimotripsina; grupos aromáticos próximos a clivagens em grupos carboxílicos livres, característica da enzima carboxipeptidase A. Vale ressaltar que a ação de algumas enzimas pode ocorrer na dependência de uma clivagem anterior, realizada por outra enzima, sendo, portanto, inviável avaliar os grupos N- e C-terminal de cada peptídeo considerando-se cada enzima do sistema enzimático isoladamente.

Para cada fragmento identificado foi gerado um valor de *score*, parâmetro que depende de diversos fatores, tais como o estado de carga do peptídeo bem como o tamanho do banco de dados que está sendo usado para a busca. Quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que esse resultado seja fruto de uma coincidência (CANTÚ, CARRILHO, WULFF *et al.*, 2008). O software *Mascot* fornece para cada busca submetida um valor limite (dependendo das condições usadas para a busca) a partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico (PERKINS, PAPPIN, CREASY *et al.*, 1999). A Figura 11 apresenta os cromatogramas das duas amostras analisadas e as linhas verticais tracejadas representam os TR dos fragmentos identificados com *score* suficientemente alto para serem considerados válidos.



**Figura 11.** Cromatogramas (CLAE-FR acoplado a espectrometria de massas) das amostras HPq > 5 kDa e HPq < 5 kDa. Cromatogramas apresentados em BPI (*Base Peak Intensity*). (A) HPq > 5 KDa: fração coletada em IMAC referente aos peptídeos com capacidade quelante da amostra > 5 kDa do hidrolisado com pancreatina; (B) HPq < 5 KDa: fração coletada em IMAC referente aos peptídeos com capacidade quelante da amostra < 5 kDa do hidrolisado com pancreatina. Os números correspondem aos fragmentos identificados (Tabela 7), em seus respectivos tempos de retenção.

Os fragmentos identificados concentram-se até o 30<sup>o</sup> minuto de corrida, e é possível observar picos com TR que não correspondem a nenhum dos fragmentos identificados. Por meio da varredura nos espectros MS das amostras, observando a distância entre os picos, pode-se determinar o número de cargas (FENN, MANN, MENG *et al.*, 1989). As cargas nos fragmentos são dadas em função do grupo N-terminal, o qual

confere uma carga a todo peptídeo, e de resíduos de aminoácidos básicos, os quais reduzem a razão  $m/z$ . A análise realizada abrangeu a faixa de razão  $m/z$  de 100 a 2000 Da. Dessa forma, peptídeos com massa superior a 2000 Da só são identificados se apresentarem resíduos básicos em sua sequência.

Contudo, o aumento da massa molecular e aumento do número de cargas resultam em um aumento do número de combinações de massa e carga possíveis para o oligômero, que levam a um congestionamento e sobreposição de picos muito próximos na escala  $m/z$  a ser resolvido pelo analisador (FENN, MANN, MENG *et al.*, 1989). Disso resulta uma diminuição da resolução efetiva, dificultando assim a identificação dos fragmentos. Os resultados para as amostras HPq < 5 kDa e HPq > 5 kDa mostraram nesta última grande quantidade de fragmentos não identificados, com mais de três cargas. Possivelmente devido aos fatores supracitados, foram identificados mais fragmentos na amostra HPq < 5 kDa em relação à amostra HPq > 5 kDa.

Recentemente, um grande esforço tem sido feito para caracterizar grandes polipeptídeos por espectrometria de massas. Porém, enquanto a separação e detecção desses peptídeos são factíveis, sua identificação permanece mais desafiadora para peptídeos bioativos como hormônios, neuropeptídeos ou simplesmente polipeptídeos bioativos produzidos por hidrólise de uma determinada enzima (PANCHAUD, AFFOLTER & KUSSMANN, 2012). A identificação dos peptídeos de maior MM na amostra HPq > 5 kDa, não realizada neste estudo poderia contribuir para compreender a diferença de afinidade ao ferro entre as duas amostras analisadas.

Alguns dos peptídeos identificados podem apresentar, além de capacidade quelante de ferro, capacidade antioxidante, pois cerca de 30% possuem resíduo do aminoácido hidrofóbico valina na posição N-terminal, e prolina (75%), tirosina (14%) ou metionina (7%) em sua sequência, características comuns à maioria dos peptídeos antioxidantes (UCHIDA & KAWAKISHI, 1992; CHEN, MURAMOTO & YAMAUCHI, 1995; ELIAS, KELLERBY & DECKER, 2008). Análise *in silico* dos peptídeos identificados, feita

utilizando-se o banco de dados do software BIOPEP (Olsztyn, Polônia), mostrou que alguns fragmentos desses peptídeos possuem atividade antioxidante comprovada, como YVEEL (PIHLANTO, 2006), identificado na  $\beta$ -Lg, e EL (SUETSUNA, UKEDA & OCHI, 2000), KD (SUETSUNA, 1999), LKP, LK, LP (HUANG, MAJUMDER & WU, 2010), e VY (CHENG, CHEN & XIONG, 2010), identificados em proteínas de outras fontes. O processo de digestão pode promover a liberação dessas sequências, as quais podem exercer atividade antioxidante no organismo.

Os peptídeos com propriedade de quelar o ferro identificados podem também exercer uma ação antioxidante indireta, por impedir o efeito pró-oxidante do ferro livre. Isso porque metais de transição como o ferro, quando livres, catalisam a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), levando à oxidação de lipídeos insaturados e promovendo danos oxidativos em diferentes níveis (SAIGA, TANABE & NISHIMURA, 2003). Já o mineral quelado possui forma química inerte e, portanto, é mais estável e menos sujeito a interações (MIQUEL & FARRÉ, 2007).

Para o melhor esclarecimento sobre por quê resíduos de determinados aminoácidos podem promover o aumento da biodisponibilidade do ferro, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários, a fim de confirmar os resultados reportados neste trabalho.

## 6. CONCLUSÃO

A enzima pancreatina originou peptídeos com maior afinidade ao ferro em relação às demais enzimas, sendo que a fração retida em membrana de corte de 5 kDa, fração HP > 5 kDa, manteve maior teor de ferro solúvel em pH 7,0 e maior precipitação de ferro em pH 3,5, sugerindo maior interação entre Fe-peptídeos.

O quelato formado entre ferro e peptídeos da fração maior que 5 kDa do hidrolisado com pancreatina mostrou ser relativamente estável às condições gástricas. A quelação torna o ferro menos reativo, podendo estar associada a uma redução dos efeitos colaterais provocados pelo  $\text{Fe}^{2+}$  livre na mucosa gastrintestinal, além de potencialmente prevenir o efeito pró-oxidante do metal.

No sequenciamento dos peptídeos das frações que apresentaram maior capacidade quelante, mais de 80% dos peptídeos apresentaram resíduos de Asp e Glu, principais sítios de ligação ao ferro citados pela literatura. Alguns peptídeos identificados apresentaram fragmentos com capacidade antioxidante; porém, todos eles podem exercer essa função de forma indireta, pois impedem o ferro de catalisar reações pró-oxidantes.

Para aprofundar os conhecimentos em relação à estrutura e estabilidade do quelato Fe-peptídeo, mais estudos são necessários. Porém, os resultados reportados no presente trabalho sugerem que a hidrólise do IPS com pancreatina pode promover a formação de peptídeos com alta capacidade quelante de ferro. A quelação do ferro por esses peptídeos pode apresentar potencial aplicação para fortificação de alimentos, no intuito de elevar a biodisponibilidade do ferro e reduzir seus efeitos pró-oxidantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986

ADLER-NISSEN, J. Proteases. In: NAGODAWITHANA, T. e REED, G. (Ed.). **Enzymes in Food Processing**. 3 ed. San Diego, California: Academic Press, Inc., cap. 7, p.159-203. 1993

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

AHRENS, R. D. **Ionization Potentials: Some Variations, Implications, and Applications**. Oxford, UK: Pergamon Press, 1983

AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Gaithersburg: AOAC 2006.

ARNOLD, F. H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 151-156, 1991.

ASHMEAD, H. D. W. **Iron (III) Amino Acid Chelates With Reducing Agents Attached Thereto**. US. US 2007/0270591 A1: 6 p. 2007.

ATKINS, R. C. Colorimetric determination of iron in vitamin supplement tablets. A general chemistry experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 52, n. 8, p. 550, 1975.

BASCH, J. J.; DOUGLAS JR, F. W.; PROCINO, L. G. et al. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with harland-ashworth procedure. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 1985.

BASOLO, F.; JOHNSON, R. C. **Coordination Chemistry. The Chemistry of Metal Complexes**. New York, USA: W. A. Benjamin, Inc., 1964

BEARD, J. L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 568S-580S, 2001.

BELL, C. F. **Principles and Applications of Metal Chelation**. Oxford: Clarendon Press, viii, 147 p. 1977

BERGMANN, M. A classification of proteolytic enzymes. In: (Ed.). **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**: John Wiley & Sons, Inc., p.49-68. 2006

BERTRAND-HARB, C.; BADAY, A.; DALGALARRONDO, M. et al. Thermal modifications of structure and codenaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. **Food / Nahrung**, v. 46, n. 4, p. 283-289, 2002.

BOZA, J. J.; MOËNNOZ, D.; VUICHLOUD, J. et al. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 237-243, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1679&word=>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Política de Alimentação e Nutrição (CGPAN). Programa nacional de suplementação de ferro. 2009. Disponível em: <<http://nutricao.saude.gov.br/ferro.php>>.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

BRISE, H.; HALLBERG, L. A METHOD FOR COMPARATIVE STUDIES ON IRON ABSORPTION IN MAN USING TWO RADIOIRON ISOTOPES. **Acta Medica Scandinavica**, v. 171, n. S376, p. 7-22, 1962.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

CARDOSO, M. A. **Nutrição Humana: Nutrição e Metabolismo** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

CARLTON JR, D. D.; SCHUG, K. A. A review on the interrogation of peptide–metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 686, n. 1–2, p. 19-39, 2011.

CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C. et al. Antioxidant and metal chelating activities of Phaseolus vulgaris L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1157-1164, 2012.

CATES, M. S.; TEODORO, M. L.; PHILLIPS JR, G. N. Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to Parvalbumin. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 3, p. 1133-1146, 2002.

CHAUD, M. V.; IZUMI, C.; NAHAAL, Z. et al. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 871-877, 2002/02/01 2002.

CHEN, H.-M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 574-578, 1995.

CHEN, W.-Y.; WU, C.-F.; LIU, C.-C. Interactions of imidazole and proteins with immobilized Cu(II) ions: effects of structure, salt concentration, and pH in affinity and binding capacity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 180, n. 1, p. 135-143, 1996.

CHENG, Y.; CHEN, J.; XIONG, Y. L. Chromatographic separation and tandem MS identification of active peptides in potato protein hydrolysate that inhibit autoxidation of soybean oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8825-8832, 2010.

CLAEYS, E.; DE SMET, S.; BALCAEN, A. et al. Quantification of fresh meat peptides by SDS–PAGE in relation to ageing time and taste intensity. **Meat Science**, v. 67, n. 2, p. 281-288, 2004.

CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N.; MOORE, E. G. Iron absorption and transport. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 213, 1999.

COZZOLINO, F.; LECCE, L.; FRISULLO, P. et al. Functional food: product development and health benefits. **Recent Patents on Engineering**, v. 6, n. 1, p. 2-19, 2012.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2 Ed. Barueri, SP: Manole, 2007

DASS, C. **Fundamental of Contemporary Mass Spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007

DAVIS, P. A.; MCDOWELL, L. R.; WILKINSON, N. S. et al. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. **Small Ruminant Research**, v. 74, n. 1-3, p. 149-158, 2008.

DEWAYNE ASHMEAD, H. The absorption and metabolism of iron amino acid chelate. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, p. 13-21, 2001.

DEWEY, K. G.; DOMELLÖF, M.; COHEN, R. J. et al. Iron supplementation affects growth and morbidity of breast-fed infants: results of a randomized trial in Sweden and Honduras. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3249-3255, 2002.

DIPLOCK, A. T.; AGGETT, P. J.; ASHWELL, M. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. S1-S27, 1999.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. London: Longmans Green, 1964

DOUCET, D.; GAUTHIER, S. F.; FOEGEDING, E. A. Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 711-715, 2001.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES III, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

EUGENE, S. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1985.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; TEUCHER, B. Iron and calcium bioavailability of fortified foods and dietary supplements. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 11, p. 360-367, 2002.

FAO/WHO. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation.** Maryland, USA: Food and Agriculture Organization / World Health Organization 1990.

FAO/WHO. **Assessing the Iron Status of Populations.** Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization / World Health Organization 2007.

FARFÁN, J. A. **Química de Proteínas Aplicada à Ciência e Tecnologia dos Alimentos.** Campinas/SP, Brasil: Editora da UNICAMP, 1990

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. **Food / Nahrung**, v. 43, n. 3, p. 165-167, 1999.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 605-616, 1996.

FRANZAN, R. **Preparação e Caracterização Físico-Química de Complexos de Hidrolisados Parciais de Proteína com Minerais** 50f dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.2006

FUQUA, B. K.; VULPE, C. D.; ANDERSON, G. J. Intestinal iron absorption. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 2-3, p. 115-119, 2012.

GALLEGOS-TINTORÉ, S.; TORRES-FUENTES, C.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L. et al. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1618-1624, 2011.

GLIGIC, L.; PALIC, T.; NIKOLOVSKI, J. The beneficial effects of iron-enriched yeast *Saccharomyces cerevisiae* biomass in poultry breeding. **Folia Veterinaria**, v. 48, n. 2, p. 104-107, 2004.

GLUSKER, J. P. Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. In: C.B. ANFINSEN, J. T. E. F. M. R. e DAVID, S. E. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry:** Academic Press, v.42, p.1-76. 1991

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2-3, p. 173-188, 2004.

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

GUPTA, A.; AMIN, N. B.; BESARAB, A. et al. Dialysate iron therapy: Infusion of soluble ferric pyrophosphate via the dialysate during hemodialysis. **Kidney International**, v. 55, n. 5, p. 1891-1898, 1999.

HAGEN, S. R.; AUGUSTIN, J.; GRINGS, E. et al. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. **Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 319-323, 1993.

HAQUE, Z. U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 5, n. 6, p. 559-571, 1992.

HOFFMANN, S. A.; KRUGER, R. L. Elaboração, análises sensorial e físico-química de biscoito rico em ferro com farinha de pulmão bovino. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 577-583, 2011.

HOYLE, N. T.; MERRLTT, J. H. Quality of fish protein hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76-79, 1994.

HUANG, G.; REN, Z.; JIANG, J. Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1527-1532, 2011.

HUANG, W.-Y.; MAJUMDER, K.; WU, J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 635-641, 2010.

HUISMAN, I. H.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. The effect of protein–protein and protein–membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 179, n. 1–2, p. 79-90, 2000.

HURRELL, R. F.; REDDY, M. B.; JUILLERAT, M. et al. Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 11, p. 2808-2812, 2006.

JERKER, P. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 3, n. 4, p. 263-281, 1992.

KAGEDAL, L. **Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications**. 2nd. New York: Wiley-VCH, 1998

KANTARCI, N.; TAMERLER, C.; SARIKAYA, M. et al. Molecular dynamics simulations on constraint metal binding peptides. **Polymer**, v. 46, n. 12, p. 4307-4313, 2005.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KARAS, M.; BAHR, U.; GIEßMANN, U. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 10, n. 5, p. 335-357, 1991.

KAZMIERSKI, M.; CORREDIG, M. Characterization of soluble aggregates from whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 685-692, 2003.

KENIG, M.; PETERNEL, Š.; GABERC-POREKAR, V. et al. Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag removal in purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, n. 1–2, p. 293-306, 2006.

KICMAN, A. T.; PARKIN, M. C.; ILES, R. K. An introduction to mass spectrometry based proteomics—Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 260–262, n. 0, p. 212-227, 2007.

KIM, S. B.; LIM, J. W. Calcium-binding peptides derived from tryptic hydrolysates of cheese whey protein. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1459-1464, 2004.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A. et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 625-631, 2007a.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN, M. A. et al. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4033-4042, 2007b.

KINGHORN, N. M.; NORRIS, C. S.; PATERSON, G. R. et al. Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 700, n. 1–2, p. 111-123, 1995.

KRATZER, F. H.; VOHRA, P. **Chelates in Nutrition**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAYRISSE, M.; GARCÍA-CASAL, M. N.; SOLANO, L. et al. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2195-2199, 2000.

LEE, S.-H.; SONG, K. B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 378-381, 2009.

LIEU, P. T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P. A. et al. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 1–2, p. 1-87, 2001.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S. R.; COLLIER, K. P. et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, n. 10, p. 2078-2086, 1996.

LIN, F. Y.; CHEN, W. Y.; HUANG, S. Y. Selective separation of caseinophosphopeptides through immobilized metal ion affinity chromatography: effects of pH values, salt concentrations and degree of phosphorylation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, n. 5, p. 467-471, 2000.

LUND, M.; ARDÖ, Y. Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe(III) affinity chromatography and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6616-6622, 2004.

LUO, Y.; XIE, W. Effect of phytase treatment on iron bioavailability in faba bean (*Vicia faba* L.) flour. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1251-1255, 2012.

LV, Y.; LIU, Q.; BAO, X. et al. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe<sup>3+</sup>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4593-4597, 2009.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MARTELL, A. E.; CALVIN, M. **Chemistry of the Metal Chelate Compounds**. New York, USA: Prentice-Hall, Inc., 1952

MARTOS, G.; CONTRERAS, P.; MOLINA, E. et al. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5640-5648, 2010.

MATHEWSON, P. R. **Enzymes**. St. Paul, Minnesota, USA: Eagan Press, 1998

MEGÍAS, C.; PEDROCHE, J.; YUST, M. M. et al. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 6509-6514, 2007.

MERCIER, A.; GAUTHIER, S. F.; FLISS, I. L. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3, p. 175-183, 2004.

MIMURA, É. C. M.; BREGANÓ, J. W.; DICHI, J. B. et al. Comparison of ferrous sulfate and ferrous glycinate chelate for the treatment of iron deficiency anemia in gastrectomized patients. **Nutrition**, v. 24, n. 7-8, p. 663-668, 2008.

MIQUEL, E.; FARRÉ, R. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 139-143, 2007.

MORALES, F. J.; FERNÁNDEZ-FRAGUAS, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 821-827, 2005.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

NCHIENZA, H. A.; MORAWICKI, R. O.; GADANG, V. P. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2273-2280, 2010.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 642-646, 2001.

NOISEUX, I.; GAUTHIER, S. F.; TURGEON, S. L. Interactions between bovine beta-lactoglobulin and peptides under different physicochemical conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1587-1592, 2002.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; PINEDA, O. et al. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 7, p. 1407-1411, 1997.

OTTE, J.; LOMHOLT, S. B.; HALKIER, T. et al. Identification of peptides in aggregates formed during hydrolysis of  $\beta$ -Lactoglobulin B with a Glu and Asp specific microbial protease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2443-2447, 2000.

OU, K.; LIU, Y.; ZHANG, L. et al. Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4894-4900, 2010.

PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3546-3559, 2012.

PARK, Y. K. Produção de enzimas industriais de origem animal. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E., et al (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo, Brasil: Edgard Blücher, v.3, cap. 15, p.363-366. 2001

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1306-1314, 2006.

PINEDA, O.; ASHMEAD, H. D. Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 381-384, 2001.

PORATH, J. Amino acid side chain interaction with chelate-liganded crosslinked dextran, agarose and TSK gel. A mini review of recent work. **Journal of Molecular Recognition**, v. 3, n. 3, p. 123-127, 1990.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. **Biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 1621-1630, 1983.

PORATH, J.; CARLSSON, J. A. N.; OLSSON, I. et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598-599, 1975.

POWER, R. **Organic Mineral Absorption: Molecular Mimicry or Modified Mobility? Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham: Nottingham University Press., 2006

PUIG, S.; ASKELAND, E.; THIELE, D. J. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 99-110, 2005.

RAMADAN, N.; PORATH, J. Fe<sup>3+</sup>-hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 321, n. 0, p. 93-104, 1985.

REDDY, I. M.; MAHONEY, A. W. Solution visible difference spectral properties of Fe<sup>3+</sup>-L-amino acid complexes at pH 6.60. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1436-1443, 1995.

REN, Z. Y.; HUANG, G. R.; JIANG, J. X. et al. Preparation and characteristic of iron-binding peptides from shrimp processing discards hydrolysates. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 348-354, 2011.

SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3661-3667, 2003.

SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S. F.; BOUTIN, Y. et al. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 3, p. 260-270, 2008.

SANYAL, A. J.; HIRSCH, J. I.; MOORE, E. W. High-affinity binding is essential for enhancement of intestinal iron and calcium uptake by bile salts. **Gastroenterology**, v. 102, p. 1997-2005, 1992.

SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J. et al. Milk protein structure—what can it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 299-310, 2002.

SCHAGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SECHINATO, S. A. **Efeito da Suplementação Dietética com Microminerais Orgânicos na Produção e Qualidade de Ovos de Galinhas Poedeiras**. 59f dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.2003

SETH, A.; MAHONEY, R. R. Binding of iron by chicken muscle protein digests: the size of the iron-binding peptides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 11, p. 1595-1600, 2000.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações**. . São Paulo: Livraria Varela, 1996

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 285-293, 1995.

SIGULEM, D. M.; TUDISCO, E. S.; GOLDENBERG, P. et al. Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 12, p. 168-178, 1978.

SILLEN, L. G.; MARTELL, A. E. **Stability Constants, Supplement No. 1**. London: Chemical Society, 1971

SLIVKA, A.; KANG, J.; COHEN, G. Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. **Biochemical pharmacology**, v. 35, n. 4, p. 553-556, 1986.

ŠLIŽYTE, R.; DAUKŠAS, E.; FALCH, E. et al. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1415-1424, 2005.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 9, p. 819-827, 1998.

SOVAGO, I.; OSZ, K. Metal ion selectivity of oligopeptides. **Dalton Transactions**, n. 32, p. 3841-3854, 2006.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1412-1416, 1967.

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

STORCKSDIECK, S.; BONSMANN, G.; HURRELL, R. F. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. S019-S029, 2007.

STOSCHECK, C. M. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press Inc., 1990

SUETSUNA, K. Separation and identification of antioxidant peptides from proteolytic digest of dried bonito. **Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)**, v. 65, p. 92-96, 1999.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 128-131, 2000.

SUGIARTO, M.; YE, A.; SINGH, H. Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1007-1013, 2009.

SUKAN, G.; ANDREWS, A. T. Application of the plastein reaction to caseins and to skim-milk powder: I. Protein hydrolysis and plastein formation. **Journal of Dairy Research**, v. 49, n. 02, p. 265-278, 1982.

SWAIN, J. H.; TABATABAI, L. B.; REDDY, M. B. Histidine content of low-molecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 2, p. 245-251, 2002.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. London: Elsevier Applied Science, v.1, p.63-110. 1992

TELLO, P. G.; CAMACHO, F.; JURADO, E. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.

TORRES-FUENTES, C.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1585-1588, 2012.

UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper(II)/ascorbate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 13-16, 1992.

UEDA, E. K.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of chromatography. A**, v. 988, n. 1, p. 1-23, 2003.

VAN UITERT, L. G.; FERNELIUS, W. C. Studies on coordination compounds. IX. The solution stabilities of the chelate compounds of a number of organic ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 2, p. 375-379, 1954.

VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; SVENNING, C. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. SupplementS1, p. 91-98, 2000.

WALCZYK, T.; KASTENMAYER, P.; STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN, S. et al. Ferrous ammonium phosphate as a new food fortificant: iron bioavailability compared to ferrous sulfate and ferric pyrophosphate from an instant milk drink. **European Journal of Nutrition**, p. 1-8, 2012.

WANG, C.; LI, B.; AO, J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn<sup>2+</sup> and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1231-1238, 2012.

WANG, X.; LI, M.; LI, M. et al. Preparation and characteristics of yak casein hydrolysate-iron complex. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 8, p. 1705-1710, 2011.

WATSON, J. T.; PARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Application and Strategies for Data Interpretation**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WINZERLING, J. J. B., P.; PORATH, J. **How to Use Immobilized Metal Ion Chromatography**. New York: 1992

WONG, D. W. S.; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E. et al. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

WONG, J. W.; ALBRIGHT, R. L.; WANG, N.-H. L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 20, n. 1, p. 49-106, 1991.

WU, H.; LIU, Z.; ZHAO, Y. et al. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 435-441, 2012.

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. (Ed.). **Enzymes in Food Processing**. 2 ed. London: Academic Press, p.123-179. 1975

YANG, B.; YANG, H.; LI, J. et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 551-555, 2011.

YU, B.; HUANG, W.-J.; CHIOU, P. W.-S. Bioavailability of iron from amino acid complex in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 1-2, p. 39-52, 2000.

ZACHARIOU, M.; HEARN, M. T. W. Protein selectivity in immobilized metal affinity chromatography based on the surface accessibility of aspartic and glutamic acid residues. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 419-430, 1995.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; WANG, L. et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 4, p. 709-719, 2009.

ZHANG, M.-N.; HUANG, G.-R.; JIANG, J.-X. Iron binding capacity of dephytinised soy protein isolate hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-6, 2011.

ZHOU, J.; WANG, X.; AI, T. et al. Preparation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4230-4236, 2012.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

ZHU, L.; CHEN, J.; TANG, X. et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2714-2721, 2008.

ZHU, L.; GLAHN, R. P.; NELSON, D. et al. Comparing soluble ferric pyrophosphate to common iron salts and chelates as sources of bioavailable iron in a Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 5014-5019, 2009.

ZIDANE, F.; MATÉOS, A.; CAKIR-KIEFER, C. et al. Binding of divalent metal ions to 1–25  $\beta$ -caseinophosphopeptide: An isothermal titration calorimetry study. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 391-398, 2012.