

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FRACIONAMENTO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE LEITE

CARLA MAÍRA BOSSU*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B746fz

Bossu, Carla Maíra.

Fracionamento de zinco em amostras de leite / Carla
Maíra Bossu. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
89 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2009.

1. Química analítica. 2. Leite. 3. Zinco. 4. Fracionamento.
5. Eletroforese em gel. 6. Método *in vitro*. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata Carla Maíra Bossu, realizada em 26 de fevereiro de 2009:



Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira



Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira



Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

*"O único lugar onde o
sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário"*

Albert Einstein

**Este trabalho é dedicado aos meus pais
Antônio Moacir e Maria de Lourdes e meus
irmãos Carina e Maninho
Meus amados.**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus por tudo em minha vida e ter me dado essa oportunidade;

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pela orientação, confiança, amizade, incentivo, conselhos, paciência, apoio e consideração demonstrada durante todo o desenvolvimento desse trabalho na Embrapa Pecuária Sudeste;

À Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira pela orientação, paciência, importantes sugestões e amizade;

Ao Prof. Dr. Joaquim Araújo Nóbrega e Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho por toda ajuda, amizade, sugestões, críticas e ensinamentos;

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade;

A todos os professores e amigos do DQ/UFSCar que contribuíram para a minha formação acadêmica e apoio institucional;

À Embrapa Pecuária Sudeste pelo espaço e oportunidade concedidos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (Processo nº: 06/59537-0);

À Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pelo apoio e disposição em ajudar;

Aos pós-graduandos e estagiários do laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, em especial ao Rodrigo e a Jenifer pela amizade, sugestões e grande ajuda no trabalho;

Aos pós-graduandos e estagiários do laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, em especial a Adriana e Juliana pela colaboração;

Ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pela amizade, colaboração e importantes sugestões no trabalho;

Ao Dr. Gilberto Batista de Souza pela amizade, apoio e sugestões;

À Dra. Edilene Cristina Ferreira pela amizade e conhecimentos passados;

À Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira pela amizade e sugestões no trabalho;

Ao Prof. Dr. Edivan Vieira de Carvalho e sua esposa Lucelina por toda amizade, colaboração e por serem sempre prestativos;

Ao Gustavo por todo carinho, amor, respeito, companheirismo, colaboração, compreensão, incentivo e paciência incondicionais;

Aos funcionários do DQ/UFSCar em especial às funcionárias da secretaria da pós-graduação, Ariane, Cristina e Luciani por toda atenção dada nos serviços burocráticos;

Aos meus amigos de graduação, em especial a Roberta, Débora, Ana Carla, Ricardo, Gustavo, Adriana, Marquinhos, Bruno e Grazielle pela ótima convivência, amizade, companheirismo, conversas e muitas risadas;

À Claudia B. Pelizaro e Juliana Cobre pela presença amiga em todos os momentos;

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, Cristina, Victor Gilbertinho, Marcos, Natal, Cida e Carlos e às estagiárias Célia e Mariana por todo apoio e auxílio; e à Maria e Rafael pela ajuda no fornecimento do leite das ovelhas;

Aos amigos e companheiros do GAIA: Adriana Alice, Adriana Nori, Allen, Amália, Ana Amália, Ana Beatriz, Andrea Oliveira, Caio, Carolina, Catarinie, Daniela, Daniele, Eveline, Fernanda, Guto, Gustavo, Juliana Ferreira, Juliana Pane, Kelber, Larissa, Mário, Marquinhos, Marcelo, Marcelo Graziani, Mirian, Natália, Patrícia, Paula, Renata, Rodolfo, Silmara, Silvéria, Silvia, Simone, Telma, Tiago e Wladiana pela amizade, companheirismo, sugestões e pelos momentos alegres;

A todos os ex-GAIA com os quais tive a oportunidade de conhecer e conviver;

Aos meus maravilhosos pais Antônio Moacir e Maria de Lourdes e irmãos Carina e Antônio Moacir Junior (Maninho) que sempre me apóiam e auxiliam em todos os momentos da minha vida, pelo imenso amor, respeito e paciência. Amo vocês.

Muito obrigada

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica (Atomic Absorption Spectrometry)
- AE-HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Coluna de Troca Aniônica (Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography)
- AFS** – Espectrometria de Fluorescência Atômica (Atomic Fluorescence Spectrometry)
- CE** – Eletroforese Capilar (Capillary Electrophoresis)
- DISC** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínua (Discontinuous Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
- ESI-MS** – Ionização por Eletrospray acoplada à Espectrometria de Massas (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
- ETAAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry)
- ETVICP-MS** – Vaporização Eletrotérmica com Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
- FAAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
- FAB-MS** – Espectrometria de Massas por Bombardeamento Atômico Rápido (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)
- FAES** – Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (Flame Atomic Emission Spectrometry)
- GFAAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)
- HGAAS** – Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry)
- HG-AFS** – Espectrometria de Fluorescência Atômica com Geração de Hidretos (Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry)
- HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
- ICP OES** – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
- ICP-MS** – Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

IEF – Eletroforese por Focalização Isoelétrica (Isoelectric Focusing)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

LA-ICP-MS – Ablação em Laser com Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

MALDI-MS – Dessorção da Matriz por Meio de Laser por Espectrometria de Massas (Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry)

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

2D-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Bidimensional (Two-Dimensional Gel Electrophoresis)

PGE – Eletroforese em Gradiente de Gel (Pore Gradient Electrophoresis)

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa (Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography)

RP-HPLC-ESI-MS-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa Acoplada com Ionização por Eletrospray Acoplada à Espectrometria de Massas (Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography- Electro spray Ionization Mass Spectrometry)

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SEC – Cromatografia de Exclusão por Tamanho (Size Exclusion Chromatography)

SEC-ICP-MS – Cromatografia de Exclusão por Tamanho Acoplada com Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Size Exclusion Chromatography combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

SEC-SAX-ICP-MS – Cromatografia de Exclusão por Tamanho combinado com Cromatografia de Troca Iônica e Detecção em Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Size Exclusion Chromatography combined with Strong Anion Exchange Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

SEC-HPLC – Cromatografia por Exclusão de Tamanho Acoplada com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Size Exclusion Chromatography combined with High Performance Liquid Chromatography)

SR-TXRF – Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (Synchrotron Radiation Total Reflection X-Ray Fluorescence)

μSR-XRF – Microfluorescência de Raios-X com Radiação Síncrotron (Micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence)

SS-GFAAS – Análise Direta de Sólidos em Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (Solid-Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

TS-AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por Spray Térmico (Thermal Spray Atomic Absorption Spectrometry)

UREA-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Uréia (Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

XRF – Espectrometria de Raios-X (X-Ray Spectrometry)

UHT – Temperatura Ultra-Elevada (Ultra High Temperature)

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1.1 – Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação microondas.....	36
TABELA 5.1.2 – Parâmetros empregados na análise por ICP OES.....	37
TABELA 5.3.1 - Padrões protéicos com diferentes massas molares.....	40
TABELA 5.4.1 - Programa de aquecimento para digestão das bandas protéicas empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.....	42
TABELA 6.1.1 – Teores totais de zinco nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 213,857 \text{ nm}$, *n=3, **mg kg ⁻¹	49
TABELA 6.1.2 – Teores totais de cálcio nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 396,847 \text{ nm}$, *n=3, **mg kg ⁻¹	49
TABELA 6.1.3 - Teores totais de fósforo nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 178,222 \text{ nm}$, *n=3, **mg kg ⁻¹	50
TABELA 6.1.4 – Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os elementos zinco, cálcio e fósforo.....	52
TABELA 6.3.1 – Programa de aquecimento otimizado para a determinação de Zn por GF AAS.....	58
TABELA 6.3.2 – Valores percentuais da distribuição de Zn nas bandas protéicas das amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , cabra integral UHT, bovino integral UHT e “leite” de soja.....	61
Tabela 6.5.1 – Concentração total de proteínas nas amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , bovino integral UHT, cabra integral UHT e “leite” de soja.....	73
Tabela 6.6.1 – Concentração total de zinco, cálcio e fósforo em amostras de ração utilizadas para a nutrição ovelha da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste.....	74
Tabela 6.6.2 – Concentração total de zinco, cálcio e fósforo em amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 5.2.1 – Esquema da separação de proteínas por UREA-PAGE: (A) Gel de empilhamento, (B) Gel de separação e (C) Tampão de corrida ou eletrodo.....	39
FIGURA 5.2.2 - Sistema de eletroforese utilizado na separação das proteínas.....	40
FIGURA 5.4.1 - (I) esquema do recipiente de amostras dentro do frasco do forno microondas com cavidade, (II) corte transversal do recipiente de amostras.....	42
FIGURA 6.2.1 – Imagem do gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de “leite” de soja (coluna 2), leite de ovelha <i>in natura</i> (coluna 3), leite bovino integral UHT (coluna 4), leite de cabra integral UHT (coluna 5) e leite bovino integral <i>in natura</i> (coluna 6).....	53
FIGURA 6.2.2 – Curva de calibração para gel de poliacrilamida (10%) com uréia gerada pela plotagem do Log de cada padrão molecular de proteína (Log PM) versus mobilidade relativa (Rf).....	54
FIGURA 6.3.1 – Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em presença do branco da amostra (gel sem banda) 1% v/v HNO_3 . (■) Curva de Pirólise e (●) Curva de Atomização. Modificador utilizado: 1,78% m/v $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	57
FIGURA 6.3.2 – Curva analítica para Zn em meio do branco da amostra (gel sem banda) 1% v/v HNO_3 . ($y = 0,1457 x + 0,0316$; $R = 0,995$).....	58
FIGURA 6.3.3 – Resultados da distribuição de Zn nas bandas protéicas das amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , cabra integral UHT, bovino integral UHT e “leite” de soja.....	60
FIGURA 6.4.1 – Resultados do Zn dialisado pelo método de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> nas amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , bovino integral UHT, cabra integral UHT e “leite” de soja.....	65
FIGURA 6.4.2 – Resultados do Ca dialisado pelo método de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> nas amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , bovino integral UHT cabra UHT, e “leite” de soja.....	67
FIGURA 6.4.3 – Resultados do P dialisado pelo método de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> nas amostras de leite de ovelha <i>in natura</i> , bovino integral <i>in natura</i> , bovino integral UHT, cabra integral UHT e “leite” de soja.....	70

RESUMO

FRACIONAMENTO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE LEITE. Neste trabalho foram feitos estudos voltados ao preparo de amostras e à especificação química dos teores de zinco presentes em amostras de diferentes tipos de leite (bovinos, ovelha, cabra e origem vegetal (soja)). A proposta visou estabelecer as diferentes proporções dos teores de zinco existentes em proteínas das amostras procurando-se observar a biodisponibilidade e a distribuição do Zn em função de tratamentos como a pasteurização. As amostras foram digeridas em forno de radiação microondas com cavidade e os teores totais de Zn, Ca e P presentes nos extratos foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Paralelamente, foi feito um estudo de separação de proteínas das amostras dos diferentes tipos de leite empregando eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de uréia (UREA-PAGE) e posterior determinação do Zn ligado às bandas protéicas. Para isso, as mesmas amostras (bandas protéicas) foram digeridas em forno de radiação microondas com cavidade e os teores de Zn foram determinados por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS). Os resultados apresentados indicam que o Zn está ligado principalmente à proteína de 32 kDa (β -caseína) nos leites bovino integral UHT e *in natura* e na proteína de 24 kDa (α -caseína) no leite de ovelha *in natura*. Não houve grandes diferenças entre a ligação de Zn-proteínas, considerando o processo de pasteurização. Após otimização das condições experimentais, digestão gástrica simulada *in vitro* foi aplicada para verificação da bioacessibilidade do Zn, Ca e P nas amostras estudadas. Os resultados confirmaram a eficiência do procedimento empregado. O processo de pasteurização do leite bovino não afetou a concentração total das proteínas.

ABSTRACT

ZINC FRACTIONATION IN MILK SAMPLES. This work studies were aimed at samples preparation and chemical speciation levels zinc in samples of different kind of milk (milk cattle, sheep, goat, and soybean milk base). The proposal aimed to establish the differences in the zinc levels in protein samples, trying to observe the distribution and zinc bioavailability due to treatments such as pasteurization. The samples were digested in a cavity microwave oven and the total Zn, Ca and P levels in extracts were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). An additional study was conducted for protein samples separation in different kinds of milk using the urea polyacrylamide gel electrophoresis (UREA-PAGE) methodology and posterior determination of Zn bound to protein bands. Therefore the protein bands were digested in the cavity microwave oven and the Zn levels were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The results displayed that Zn is mainly bound to 32 kDa (β -casein) protein in UHT whole milk and to the 24 kDa (α -casein) protein in raw sheep milk. There were not major differences between the Zn-proteins binding at the pasteurization process. After optimization experimental conditions, *in vitro* simulated gastric digestion was applied to Zn, Ca and P bioaccessibility in the studied samples. The results confirmed the adopted methodology efficiency. Furthermore, the pasteurization process did not affect the total proteins concentration of bovine milk.

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
2 – Objetivos	5
3 – Revisão Bibliográfica	7
3.1 – Especificação química em amostras de leite.....	8
3.2 – Zinco.....	15
3.3 – Cálcio.....	18
3.4 – Fósforo.....	20
3.5 – A importância do leite.....	21
3.5.1 – Leite Bovino.....	21
3.5.2 – Leite de Cabra.....	22
3.5.3 – Leite de Ovelha.....	23
3.5.4 – “Leite” de Soja.....	25
3.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida	27
4 – Material e Métodos	31
4.1 – Instrumentação.....	32
4.2 – Reagentes e Soluções.....	32
4.3 – Descontaminação dos materiais.....	33
4.4 – Amostras e materiais de referência certificados.....	34
5 – Procedimento Experimental	35
5.1 – Determinação dos teores totais.....	36
5.2 – Gel de Eletroforese.....	37
5.3 – Estimativa do Massa Molar das Proteínas.....	40
5.4 – Determinação de zinco em bandas protéicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.....	41
5.5 – Estudos da bioacessibilidade <i>in vitro</i> para zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite.....	43
5.6 – Determinação das proteínas totais nas diferentes amostras de leite.....	45
5.7 – Determinação de zinco, cálcio e fósforo nas rações dadas como alimento da raça Santa Inês.....	45
6 – Resultados e Discussão	47
6.1 – Determinação dos teores totais.....	48
6.2 – Gel de Eletroforese.....	52

6.3 – Determinação de zinco em bandas protéicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite.....	56
6.4 – Estudos da bioacessibilidade <i>in vitro</i> para zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite.....	63
6.5 – Determinação das proteínas totais nas diferentes amostras de leite.....	71
6.6 – Determinação de zinco, cálcio e fósforo nas rações dadas como alimento da raça Santa Inês.....	74
7 – Conclusões	76
8 – Referências Bibliográficas	79

Capítulo 1

Introdução

1 – Introdução

O leite é uma fonte de alimento complexa que contém todos os nutrientes para o crescimento e o desenvolvimento, principalmente dos recém-nascidos (CAVA-MONTESINOS, et al., 2005). Sua importância, sob o ponto de vista nutricional, deve-se à qualidade de suas proteínas, aos elevados teores de cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A, riboflavina e niacina, sendo considerado o alimento natural mais próximo da composição ideal. Normalmente, o leite é de fácil digestão, porque contém os aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que o organismo humano não é capaz de sintetizar, em quantidades e proporções adequadas (ALEIXO, 2000). O leite bovino apresenta um lugar especial na dieta humana porque é utilizado como alimento desde a infância até a idade adulta. Além disso, a composição química e a determinação dos teores de minerais no leite são importantes para o entendimento da influência fisiológica na nutrição humana e animal e sobre a toxicidade e essencialidade dos elementos traço. Esses conhecimentos também contribuem com o monitoramento das espécies responsáveis pelos processos de transformação, tais como fermentação, onde vários ânions (ex. fosfatos e cloretos), devem ser controlados para obtenção de condições satisfatórias, entre as quais o sabor (BULDINI et al., 2002).

Por se tratar de uma matriz muito complexa para análises devido aos elevados teores de compostos orgânicos, várias abordagens usando digestões apropriadas, como digestões assistidas por radiação microondas e métodos de solubilização têm sido propostas para determinar o conteúdo total de espécies inorgânicas em amostras de leite (SILVA et al., 2001). Outros estudos mostram métodos de decomposição ácida de amostras de leite utilizando via seca, via úmida e forno de radiação microondas com cavidade (DE LA FUENTE et al., 1995; KRUSHEVSKA et al., 1992).

Todas as práticas de manejo de ordenha, assim como uma suplementação adequada de minerais são importantes para a saúde do animal e a qualidade do leite. Desta forma, a determinação dos teores de minerais no leite é um importante parâmetro do ponto de vista sanitário e nutricional (COSTA, 1998).

O leite é responsável por cerca de 25% do total diário de zinco recomendado (BULDINI et al., 2002; RUZ et al., 2005). Outras fontes de zinco são

ostras, camarão, carne bovina, de frango e de peixe, fígado e gérmen de trigo (COZZOLINO, 2005).

O zinco é um elemento traço essencial na nutrição humana e animal e participa da síntese e da degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Pode também estar presente na dieta, associado às moléculas orgânicas e na forma de sais inorgânicos (SCHEPLYAGINA, 2005). Aminoácidos como a histidina e a metionina, além de fosfatos e ácidos orgânicos ajudam na biodisponibilidade deste elemento e alguns fatores que podem afetar essa disponibilidade são o fitato e alguns elementos potencialmente tóxicos como cádmio que podem formar complexos insolúveis no trato intestinal, sendo excretados.

A deficiência de zinco pode provocar anorexia, baixo crescimento e problemas na pele. Estudos que envolveram diferentes separações cromatográficas indicaram a existência de diferenças quanto à forma de associação entre o Zn e proteínas nos leites humano e bovino, sendo que no leite bovino o Zn formaria o complexo Zn-caseína-Ca-P e no leite humano a espécie Zn-citrato seria a predominante (MICHALKE, 2003). O cálcio e o fósforo são alguns dos minerais encontrados em maiores concentrações no leite, além de estarem também associados às proteínas mais importantes, dentre elas, a caseína.

O cálcio apresenta um importante papel na estrutura do organismo, como a sustentação para o esqueleto e como protetor dos órgãos internos e sua deficiência podem causar osteoporose, raquitismo e hipertensão. A vitamina D é essencial na absorção do cálcio e este é bastante absorvido pelo consumo de alguns alimentos, principalmente o leite. (COZZOLINO, 2005).

O fósforo apresenta uma função de tampão em sistemas ácidos ou alcalinos nos organismos vivos. Armazena a energia do metabolismo e participa da ativação de diversas enzimas pela fosforilação. A deficiência de fósforo é muito rara, porém pode ser causada pela ingestão crônica de antiácidos e problemas de alcoolismo. A maior parte da absorção ocorre como fósforo inorgânico no organismo. É absorvido por todo intestino delgado, no duodeno se dá por mecanismos de transporte ativo e neste caso o transporte de fósforo se dá pelo co-transporte do íon sódio (COZZOLINO, 2005).

Na área ambiental, biologia, medicina e bioquímica, estudos a respeito da ligação metal-proteína tornam-se cada vez mais necessários para conhecimentos

sobre a toxicidade, biodisponibilidade, transporte e a determinação das propriedades físico-químicas de um elemento.

A estimativa da biodisponibilidade, isto é, a capacidade do nutriente ingerido se tornar parte integrante do organismo que o ingeriu e a bioacessibilidade, que se refere a informações quanto à absorção de um determinado nutriente, juntamente com a determinação das formas químicas relacionadas às fontes de minerais utilizados é importante, pois muitas vezes podem ser determinados altos teores, porém esses teores totais não se encontram disponíveis do ponto de vista nutricional ou ambiental. Os minerais podem se apresentar na forma inorgânica (óxidos, sulfatos, carbonatos, etc), ou na forma orgânica, sendo que geralmente as fontes inorgânicas apresentam baixa biodisponibilidade. Em alguns casos, já foi observado que a suplementação com óxido está relacionada à deficiência do mineral. Assim, informar somente o conteúdo total de um elemento em uma amostra não é suficiente na avaliação de seu potencial de ação (COZZOLINO, 2005; SILVA et al., 2001).

A técnica de eletroforese em gel, bem como outras técnicas como eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) entre outras técnicas cromatográficas, são utilizadas para estudos de especificação (GARCIA, 2006). A eletroforese em gel de poliácridamida é uma técnica relativamente simples e com alta seletividade. Consiste na separação de moléculas (e.g. proteínas, ácido desoxirribonucléico – DNA e ácido ribonucléico – RNA) carregadas em um determinado meio sobre a influência de uma diferença de potencial. Dessa forma, as moléculas são separadas de acordo com o tamanho – as de menores massas molares migram primeiro do que as de maiores massas molares (SILVA Jr., 2001).

Assim, existe uma grande demanda por procedimentos que possibilitem a determinação da concentração, da forma química e do valor nutritivo de elementos traço nos alimentos, os quais podem viabilizar a possibilidade de se obter informações relevantes a respeito da ligação metal-proteína. O desenvolvimento de metodologias analíticas exatas e seletivas para a quantificação dessas diferentes espécies é de extrema importância (MICHALKE, 2003).

Capítulo 2

Objetivos

2 – Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a distribuição de zinco em diferentes frações protéicas das amostras de leite bovino integral UHT e bovino integral *in natura*, leite de ovelha *in natura*, leite de cabra integral UHT e “leite” de soja.

Estimar a bioacessibilidade dos elementos zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite após a aplicação do método de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 – Especificação química em amostras de leite

A importância da especificação química de elementos traço é hoje bastante reconhecida, sendo que o seu desenvolvimento metodológico, iniciado nos anos 70, apresentou significativo avanço na última década. O termo especificação, definida pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) é usado para indicar a distribuição de uma espécie em uma determinada amostra ou matriz, e refere-se à atividade analítica na identificação e nas medidas de espécies, já fracionamento foi definido como o processo de classificação ou grupo de analitos para uma determinada amostra de acordo com suas propriedades físicas (e.g., tamanho, solubilidade) ou químicas (e.g., ligantes, reatividade) (TEMPLETON et al., 2000; CARUSO e BAYON, 2003; CAMPOS e GRINBERG, 2001). Uma espécie química é definida como uma forma específica de uma substância ou elemento químico, como uma molécula, estrutura de um complexo ou um estado de oxidação (espécies redox), pela fase na qual se encontram, ou seja, dissolvidas, coloidais, suspensas e adsorvidas ou também pela solubilidade em solvente específico que pode ser água, soluções salinas e ácidas (CARUSO e BAYON, 2003; DE LA GUARDIA et al., 1999).

A amostragem é de extrema importância para especificação, pois deve ser representativa e usada para preservar a informação original sobre as espécies em equilíbrio. Para isso, a seqüência analítica (amostragem, pré-tratamento, separação, detecção e tratamento dos dados) requer uma maior preocupação do que a determinação da concentração total. A etapa de pré-tratamento da amostra que pode ser uma simples diluição, métodos de extração, filtração, derivatização, pré-concentração, entre outras, deve ser bastante controlado, evitando problemas de contaminação, perdas e alteração do equilíbrio biológico ou químico da espécie nativa (CARUSO, et al., 2003; MICHALKE, 2003).

Algumas das razões mais importantes de se estudar especificação química é que a toxicidade, a biodisponibilidade, o transporte e as propriedades físico-químicas de um elemento podem ser um diferencial, dependendo de sua forma química. Por exemplo o Zn, que é um elemento traço essencial, no leite bovino ocorre em complexos Zn-caseína-Ca-P, forma na qual sua biodisponibilidade

para recém-nascidos é baixa. Por outro lado, no leite humano as espécies de zinco estão na forma de complexos Zn-citrato, facilmente quebrado no intestino da criança, fazendo com que esse elemento seja prontamente disponível (MICHALKE, 2003).

A maior parte das técnicas utilizadas para separação de diferentes espécies são as técnicas cromatográficas, especialmente em elementos associados com proteínas, complexos inorgânicos e macromoleculares, tais como cromatografia gasosa e líquida, eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de troca aniônica (AE-HPLC), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC) (CARUSO e BAYON, 2003).

Para identificação e caracterização, têm sido utilizadas técnicas acopladas, tais como ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS), espectrometria de massas por bombardeamento atômico rápido (FAB-MS) e dessorção da matriz por meio de laser por espectrometria de massas (MALDI-MS). Porém, as técnicas mais utilizadas para detecção são as espectrometrias de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (CAMPOS e GRINBERG, 2001; BERMEJO et al., 2001; MIQUEL et al., 2005).

Nas últimas três décadas, a especiação de zinco em leite tem se apresentado como importante campo para a ciência nutricional com relação à saúde humana. Sintomas de *Acrodermatitis enteropathica* (AE) ocorreram especialmente em crianças com desordem hereditária de reabsorção de zinco quando estas não se alimentavam mais do leite materno e sim de leite bovino. Duas matrizes de leite foram retiradas de gordura e separadas em filtração em gel. As frações protéicas foram obtidas e analisadas por espectrometria de absorção atômica. Observou-se que o zinco estava ligado, no leite bovino, a proteínas de alta massa molar, enquanto que no leite humano, a proteínas de baixa massa molar (Zn-citrato) (CORNELIS et al., 2005).

Estudos simples de fracionamento do leite mediram os conteúdos selecionados de nutrientes, incluindo gordura, proteína, lactose, cálcio, fósforo, zinco, ferro, cobre e vitamina A em amostras de banco de leite materno. No caso do zinco, 40 a 70% estão presentes no soro, 10 a 30% na gordura e 10 a 45% na caseína. Além disso, foi descrito que o processamento do leite não altera o conteúdo

dos nutrientes, mas pode resultar em mudança significativa da distribuição relativa de zinco, com diminuição na fração do soro e aumento na fração de gordura (GÓES et al., 2002).

BLAKEBOROUGH et al. (1983) estudaram a ligação do zinco em amostras de leite de vaca e leite humano depois de análises em coluna de Sephadex e concluíram que em ambas as amostras, o zinco estava associado a proteínas de alta massa molar (maiores que 100 kDa). A precipitação da caseína em pH 4,6 e a filtração do soro ácido em coluna de Sephadex possibilitaram a recuperação em torno de 90% do zinco como compostos de baixa massa molar (Zn-citrato). As caseínas do leite bovino, após ultracentrifugação, foram colocadas na coluna de Sephadex resultando em dois picos que continham zinco e mostra que 95% do zinco está ligado a micelas da caseína, conhecidas por apresentar altas massas molares e subunidades de 20 a 30 kDa; outra resolução mostra que frações das misturas complexas de $\alpha - k -$ caseína e $\alpha - \beta -$ caseína apresentam-se ligadas a significativas quantidades de zinco. Já no precipitado do leite humano obtido por ultracentrifugação foram encontrados apenas 40% do total de zinco. Porém, análises do precipitado e do sobrenadante, em coluna de Sephadex indicaram que 85% do zinco está associado com proteínas maiores que 150 kDa, podendo se tratar da lactoferrina.

Para estudos de especiação de selênio e telúrio em diversas amostras de leite foi desenvolvido um método para diferenciar os estados de oxidação do Se e Te em seus estados de oxidação (IV) e (VI) por espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS). O procedimento envolveu uma prévia sonicação com água régia por 10 min em banho de ultrassom. O Se(IV) e o Te(IV) foram determinados sem uma etapa de pré-redução da amostra, sendo que os teores totais de Se e Te foram determinados depois da redução com KBr. O método proporcionou limites de detecção, respectivamente, de 0,012 e 0,023 ng mL^{-1} para Se(IV) e Te(IV) e desvios padrão de 10,5%, 3,9%, 12,0% e 12,5% foram encontrados para as determinações de Se(IV), Se(VI), Te(IV) e Te(VI) em amostras de leite contendo selênio de 11,1 a 32,2 ng g^{-1} e Te de 1,1 a 10,0 ng g^{-1} . Os valores de recuperação variaram de 93,5 a 103,5% para Se (IV), de 96,2 a 104,9% para Se (VI), de 92,1 a 104,8% para Te(IV) e 92,7 a 102,3 % para Te(VI), isso evidencia que não houve modificação do estado de oxidação ou perdas durante a sonicação com água régia dos elementos considerados. Para a validação do método desenvolvido a

soma dos resultados da especiação de Se e Te em amostras sonicadas por HG-AFS foi comparada com os obtidos por ICP-MS depois da digestão ácida assistida com radiação microondas, apresentando resultados coincidentes (CAVA-MONTESINOS et al, 2004).

MUNIZ-NAVEIRO e colaboradores (2005) determinaram a concentração total de selênio após digestão ácida assistida por radiação microondas usando espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos em 19 amostras de leite bovino integral e 18 de leite desnatado. Os níveis de selênio total encontrados foram na faixa de 8,5 a 21 $\mu\text{g L}^{-1}$. A distribuição de selênio em soro, gordura e micelas da caseína do leite de vaca comercial foi estudada depois da separação por ultracentrifugação. Os níveis de selênio no soro foi entre 7,1 - 14,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, na caseína foi de 3,3 - 7,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na gordura 1,2 - 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de detecção para o leite bovino integral, soro e caseína foram, respectivamente, 0,074, 0,065 e 0,075 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as recuperações foram em torno de 100,9 e 96,9% para o soro e as micelas da caseína, respectivamente.

Estudos de fracionamento e especiação dos soros de leite humano, UHT (do inglês – Ultra High Temperature), bovino e leite formulado foram feitos utilizando HPLC acoplado a ICP-MS para elementos Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, I, Br, Ca e Mg. Para estudos de especiação de cobre, 61-81% estão presentes em regiões de alta massa molar (>180 kDa) no leite UHT. No soro do leite bovino integral, o perfil do cobre mostra um importante pico em 107 kDa (33-41%), região relacionada à lactoferrina e à ovoalbumina. Esse elemento químico mostrou comportamento similar no soro de leite formulado, no soro de leite UHT e no soro do leite humano, sendo o primeiro pico (>180 kDa) equivalente a 32-50% e o segundo pico (94 kDa) a 29-46% do teor total. O elemento Fe obteve um pico para soro de leite bovino na fração equivalente a 2,7 kDa. No leite humano houve a presença de dois picos, o primeiro de 47-75% e o segundo de 25-52%. Para soro de leite formulado, a distribuição obtida foi: >180 kDa (5-8%), 81 kDa (15-22%), 52 kDa (22-30%), 13,5 kDa (7-14%), 2,7 kDa (16-22%) e <1,4 kDa (18-25%). Estudos com o elemento Zn mostraram para soro de leite bovino, que em massas molares >180 kDa foram observados 26-51% e em 2,7 kDa de 44 a 69%. No soro de leite formulado existe uma distribuição homogênea e no soro de leite humano, obedeceu à seguinte distribuição: >180 kDa, 25 a 45% e 2,7 kDa, de 22 a 55%. A maior parte do manganês encontrado no leite humano e no leite formulado (de 86 a 95%) estava presente em frações de baixas

massas molares (<1,4 kDa). Para os elementos Ca, Mg e Sr foram observados perfis semelhantes para os diferentes tipos de leite presentes em regiões de baixas massas molares (<1,4 kDa), o que também foi observado para iodo e bromo (MARTINO et al., 2002). Estudos similares para elementos como Cd e Pb indicaram uma distribuição equivalente, com 52 a 50% dos elementos ligados a porções de altas massas molares e de 48 a 50% ligados a proteínas de baixas massas molares (CONI et al., 2000). Os elementos Al, Cr e Ni foram encontrados em frações de baixas massas molares (α -Lactoalbumina (α -La), β -Lactoglobulina (β -LG), peptonas, proteases, etc) e altas massas molares (caseínas (CNs), imunoglobulinas (Igs) e albumina de soro bovino (BSA) (CONI et al., 1996).

Análises de especiação de cálcio, ferro e zinco foram feitas em frações de caseína fosfopeptídicas (CPP), depois de obtidas as frações solúveis por método de digestão *in vitro*, em leite formulado, através de AE-HPLC, identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa acoplada com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas (RP-HPLC-ESI-MS-MS) e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e o fósforo foi determinado pelo método espectrofotométrico baseado na formação do complexo fosfomolibdato. Cálcio e fósforo foram detectados em todas as frações analisadas por AE-HLPC. Já cálcio e zinco poderiam estar ligados a CPP derivadas da α ₁-CN e α ₂-CN e o ferro estaria ligado a CPP e ao β -CN(15-34)4P que estavam presentes na seqüência do grupo S(P)S(P)S(P)EE (MIQUEL et al., 2005).

A especiação de manganês foi feita em leite humano com o emprego de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) combinada com cromatografia de troca iônica e detecção em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (SAX-ICP-MS). Uma das primeiras tentativas desse trabalho foi produzir sub-frações por centrifugação e a determinação de Mn por ICP OES. A concentração total foi de 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2,85 $\mu\text{g L}^{-1}$ em frações sem gordura e 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em frações de grânulos e 2,60 $\mu\text{g L}^{-1}$ em frações do sobrenadante. As frações sem gordura foram investigadas por cromatografia de exclusão por tamanho acoplada com espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (SEC-ICP-MS) e o Mn foi encontrado predominantemente em proteínas de baixa massa molar em torno de 600 Da, 500 Da, 300 Da e 260 Da. Nas investigações em SEC-SAX-ICP-MS, ou seja, com um esquema analítico em duas dimensões (SEC+SAX) permitiu monitoramento, caracterização e identificação, assim, foram encontradas

espécies de Mn-citrato e espécies inorgânicas, como $MnCl_2$ (MICHALKE e SCHRAMMEL, 2004).

Outro estudo de fracionamento foi feito para análise da distribuição de zinco, cobre, selênio, manganês e ferro, agora comparando o leite de camelo com os leites humano, vaca e leite formulado. O leite de camelo é maior em concentrações de Mn e Fe comparado com os leites de vaca, humano e formulado. O leite humano contém baixa concentração de Zn e alta concentração de Cu em relação aos leites de camelo, vaca e formulado e a concentração de Se foi similar em todas as amostras estudadas. Aproximadamente 50 a 80% de zinco, cobre e manganês em leite de camelo estavam associados à fração da caseína, similar ao leite bovino e grande parte de Se e Fe em leite de camelo e leite bovino estavam associados à proteínas de baixas massas molares. Além disso, no leite humano, Zn, Cu, Mn e Se estavam associados à fração do soro. Exceto para Se, a fração de gordura do leite humano contém altas concentrações de Zn, Cu, Se, Mn e Fe em relação a esta mesma fração para os leites dos animais (AL-AWADI e SRIKUMAR, 2001).

Devido a poucos estudos sobre a absorção de magnésio em dietas infantis, sua absorção foi avaliada em filhotes de ratos. Foram variadas as fontes de proteínas e de carboidratos, assim como os teores de Mg, Ca e P; e magnésio fortificado. Foram separadas frações de gordura, solúveis e insolúveis, sendo que mais de 62% do Mg foi encontrado na fração solúvel. A comparação de ^{28}Mg e o Mg natural em frações nas dietas mostraram similaridades e métodos de digestão *in vitro* diminuíram a porcentagem de magnésio. A retenção de ^{28}Mg – lábil em dietas para filhotes de ratos, depois de quatro horas intubados, foi de 51 a 92%-95% do Mg se encontrava associado a compostos de baixas massas molares. Não houve diferenças significativas para o Mg entre as amostras de leites humano, de vaca e de leite formulado e apresentou alta biodisponibilidade nas dietas para crianças nos primeiros anos de vida, sem influência da mudança da composição (LÖNNERDAL et al., 1993).

Fracionamento de elementos como Ca, Mg, Fe e Zn em leite bovino UHT também foi feito em duas colunas de troca iônica e detecção por FAAS. O método foi baseado na sorção de diferentes espécies metálicas em duas colunas, uma de troca catiônica e outro de troca aniônica, e os grupos metálicos foram eluídos com HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e posteriormente determinado no FAAS. Alguns resultados mostraram 67% do total de cálcio e de 92 a 98% de magnésio estão

associados às micelas de caseína (CPP). No caso do ferro, este apresenta uma tendência a se ligar à lactose ou a oligossacarídeos, capazes de formar complexos aniônicos com cátions metálicos, sendo que quase todo zinco pode estar ligado a espécies inertes como imunoglobulinas e resíduos de caseína (POHL e PRUSISZ, 2007).

BERMEJO et al. (2001) estudaram o fracionamento de cobre utilizando cromatografia por exclusão de tamanho acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência (SEC-HPLC) e determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) em soro de leite materno e fórmula infantil. O cobre se apresentou predominantemente em frações com bandas protéicas de 76 kDa (30% do conteúdo da fração protéica estudada) e 15 kDa (25%) em leite materno e para formulação infantil de leite bovino apresentou bandas protéicas de 14 kDa (36%) e 38 kDa (31%). Outro trabalho com soro de diferentes leites (BRÄTTER et al., 1998) utilizou métodos de separação de proteínas combinados com métodos de determinação de elementos traço nas frações eluídas com HPLC e ICP OES e ICP-MS para Ca, K, Mg, P, S, Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se e Zn e também em metais potencialmente tóxicos, como Cd e Pb. No soro do leite humano foi encontrado cobre, selênio e zinco em regiões de baixa massa molar. A comparação do teor de ferro no leite materno com leites formulados (soja, bovino) mostra que é muito maior a concentração deste elemento em leite formulado, devido às suplementações desses alimentos, sendo que as formas de ligação do ferro são muito diferentes nessas duas amostras. Investigação em amostras de leite materno em diferentes regiões do mundo mostrou que o perfil de Se e Mo depende da dieta regional materna. Além disso, estudos em leite materno demonstraram que o aumento no conteúdo de selênio muda significativamente a ligação Zn-citrato, ou seja, o citrato, que é um componente ligante do Zn, diminui com o aumento da dieta em selênio.

Pelo exposto é possível se verificar o grande interesse e a importância que vem sendo dada ao desenvolvimento de procedimentos que possibilitem avaliar a forma química dos elementos nos alimentos em geral, mais especificamente, conforme a revisão não sistemática apresentada, às amostras de leite, dada a grande disponibilidade deste alimento para as populações em geral. Fica claro também que não existe um consenso com respeito à distribuição do Zn nas diferentes formas e fontes de leite. Com o conhecimento das principais formas

químicas é possível se estudar a biodisponibilidade de um dado elemento. Assim, será possível aprimorar a dieta dos animais para a produção de alimentos mais indicados para as populações.

3.2 – Zinco

O zinco, nome de origem alemã “zink” foi descoberto por Andreas Marggraf em 1500 na Alemanha. Cem anos depois, o zinco foi reconhecido como um elemento distinto, usado para fazer bronze (mistura de cobre e zinco). A fusão do minério zinco com cobre foi descoberta em Cipros e mais tarde em Roma. O zinco metálico era produzido no século 13 na Índia pela redução da calamina (carbonato de zinco, $ZnCO_3$) com substâncias orgânicas como a lã (<http://www.webelements.com/zinc>).

O zinco apresenta uma maior tendência a formar compostos covalentes. Pertence ao grupo 12 da tabela periódica, com estado de oxidação +2. É empregado em grandes quantidades para revestir objetos de ferro e evitar a corrosão e pode ser aplicado na eletrólise (galvanização). Grandes quantidades de zinco são utilizadas na fabricação de ligas como bronze. É o metal mais usado em peças metálicas e o óxido de zinco pode ser usado como pigmento branco em tintas (LEE, 2001). O zinco difere dos outros metais de transição, pois contém o nível eletrônico “d” completo. Além disso, age como ácido de Lewis para aceitar um par de elétrons, fazendo com que seja um íon estável e pode ter caráter anfótero quando seus compostos comportam-se como ácido/base de Bronsted-Lowey (MAFRA e COZZOLINO, 2004).

O zinco em água do mar foi determinado diretamente por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite usando as condições STPF (Stabilized Temperatura Plataform Furnace) com corretor radiação de fundo baseado no efeito Zeeman. Este elemento foi determinado sem modificador químico e o limite de detecção foi de $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$. Com modificador NH_4VO_3 , o limite de detecção foi diminuído para $0,024 \mu\text{g L}^{-1}$ (HUANG e SHIH, 1995). Estudos também utilizaram análise por injeção em fluxo com decomposição em linha, empregando forno de microondas com radiação focalizada para amostras de tecido adiposo e determinação de zinco e ferro por GFASS. Os resultados indicaram teores entre 2,3-8,6 e 1,5-4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn e Fe, respectivamente (BURGUERA et al., 1995).

Estudos foram feitos com o propósito de comparar a digestão de amostras de leite por via seca e via úmida. Para aquecimento por via seca foram utilizadas temperaturas de 400 a 700 °C e H_3BO_3 , $Mg(NO_3)_2$ e H_2SO_4 . Como resultados a temperatura de 500 °C teve uma recuperação de zinco superior a 95%, carbono residual inferior a 0,05%, porém houve perdas do zinco em altas temperaturas, especialmente na presença de cloretos, sendo que o tempo de digestão foi de 700 min. Já para digestão em via úmida incluindo chapa de aquecimento, HPA (High Pressure Asher) e frascos abertos e fechados em sistemas de radiação microondas, utilizando apenas HNO_3 ou combinações de H_2O_2 ou H_2SO_4 , pode-se obter recuperações maiores que 95% em todos os procedimentos e menores teores de carbono residual quando se aumentavam as pressões em sistemas de radiação microondas com cavidade, com frascos construídos com PFA (polietileno modificado). Os teores de Zn foram determinados por ICP OES (KRUSHEVSKA et al., 1992). Em trabalhos utilizando digestão ácida de leite bovino com radiação microondas com cavidade comparado com decomposição por via seca foram determinados os teores de Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Nessas mesmas amostras, os teores totais de Mn e Zn em frações do soro do leite foram determinados por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS), com limites de detecção de 0,07 e 0,28 $\mu g L^{-1}$, respectivamente. O procedimento de digestão por radiação microondas foi de apenas 15 min, tendo apresentado melhor precisão (reprodutibilidade) (DE LA FUENTE et al., 1995).

Os teores de Cu e Zn em leite bovino e suco de frutas foram determinados por espectrometria de absorção atômica por spray térmico (TS-AAS). Não houve a necessidade de pré-tratamento das amostras, apenas diluição em água ou em aminas terciárias solúveis em água. Os limites de detecção para Cu e Zn foram de 2,2 e 0,91 $\mu g L^{-1}$, respectivamente e 3,2 $\mu g L^{-1}$ de cobre para aminas terciárias solúveis em água, com recuperações variando de 97,7 a 105,3% (NASCENTES et al., 2004).

O zinco é o segundo elemento-traço mais abundante no corpo humano e sua essencialidade para organismos vivos foi comprovada em 1869 por Raulin citado por COZZOLINO (2005). Estudos mostram que o zinco é um dos elementos traço mais importantes na nutrição humana, sendo um componente essencial para a atividade de mais de 300 enzimas e estabilizador de estruturas moleculares, além de

fazer parte da síntese e da degradação de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Pode estar presente na dieta, associado às moléculas orgânicas, por exemplo, proteínas, fitatos e carboidratos, ou na forma de sais inorgânicos, como em suplementos ou em alimentos fortificados (SCHEPLYAGINA, 2005).

A recomendação deste nutriente para a população sadia é de 8 mg dia⁻¹ para mulheres e 11 mg dia⁻¹ para homens. Alguns alimentos diferem no seu conteúdo de zinco, variando de 0,002 mg/100 mg de clara de ovo, 1 mg/100 g de frango até 75 mg/100 g de ostras. Mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos são considerados as melhores fontes de zinco (MAFRA e COZZOLINO, 2004).

Fontes de zinco que não contém constituintes químicos que inibem sua absorção como aminoácidos (cisteína e histidina) melhoram sua solubilidade (MAFRA e COZZOLINO, 2004). Porém, o conteúdo de fitato presente nos alimentos reduz a biodisponibilidade do zinco. A presença do cálcio pode acentuar o efeito do fitato na baixa disponibilidade do zinco e o ferro em altas concentrações, como alimentos com suplementação deste nutriente, inibem a ação do zinco (PEDROSA e COZZOLINO, 1993). Por outro lado, altas concentrações do zinco inibem a biodisponibilidade de cobre. Cádmio pode complexar com zinco no trato intestinal e ser excretado, comprometendo sua ação (COZZOLINO, 2005). A caseína em leite tem mostrado um efeito negativo na absorção do zinco. Foi encontrado que a absorção do zinco é maior com leite bovino formulado para crianças do que em leite bovino puro, pois os soros dos leites formulados são ajustados. Em vista disso, trabalhos concluíram que a caseína tem efeito menor na absorção do zinco com relação às proteínas do soro (LONNERDAL, 1998).

Foram feitos estudos da biodisponibilidade de zinco nos leites humano, leite bovino, leite bovino formulado, soro de leite bovino formulado e fórmula a base de soja. Na adição de isótopo de zinco na alimentação de ratos pode-se concluir que o zinco disponível foi 28% para leite humano, 24% de soro de leite bovino formulado, 15% de leite bovino, e 10% na fórmula de soja (SANDSTROM et al., 1983). O zinco pode ser eliminado do organismo por meio dos rins, da pele e do intestino. As perdas endógenas intestinais podem variar de 0,5 a 3 mg dia⁻¹ (MAFRA e COZZOLINO, 2004).

A deficiência de zinco pode provocar anorexia, baixo crescimento e defeito no crescimento fetal, cicatrização lenta, intolerância à glicose pela diminuição

de produção de insulina, impotência sexual e atrofia testicular, atraso na maturação sexual e esquelética, restrição da utilização da vitamina A, desordens de comportamento, aprendizado e memória, diarreia e dermatites (SENA e PEDROSA, 2005).

No organismo bovino, cerca de um terço da absorção do zinco ocorre no abomaso, sendo o restante absorvido pelo intestino delgado. O zinco absorvido no intestino é levado até o fígado, que é o maior órgão do metabolismo de zinco, sendo excretado principalmente pelas fezes, mas quantidades significativas são excretadas no suor, especialmente em regiões tropicais (CONRAD et al., 1985).

Antigamente, acreditava-se que a deficiência de zinco era rara em bovinos. Conhecia-se somente a sua deficiência em suínos, em geral condicionada por excesso de Ca na alimentação. Hoje se sabe, porém, que a deficiência de Zn ocorre em bovinos, em extensas regiões do mundo, inclusive no Brasil (GONZÁLEZ et al., 1998).

A deficiência de zinco para animais em pastejo pode causar consumo reduzido de alimentos, redução do crescimento e da eficiência alimentar, seguido por desordens na pele. Essa deficiência severa de zinco manifesta-se no pescoço, estômago, escroto e pernas do animal, além de interferir nos órgãos sexuais do macho e em todas as fases do processo reprodutivo na fêmea, interferindo, dessa forma, na produção do leite (CONRAD et al., 1985).

Em resumo, a determinação dos teores de Zn em amostras alimentícias contribui tanto na prevenção de doenças como no entendimento dos mecanismos envolvidos no seu metabolismo, tanto na nutrição humana como animal.

3.3 – Cálcio

O elemento cálcio, do latim "*calx*" que significa "*cal*", foi descoberto por Sir. Humphrey Davy em 1808 na Inglaterra. O metal foi isolado pela eletrólise de uma mistura de cal e óxido de mercúrio (HgO). Compostos como a cal (CaO, óxido de cálcio) foram preparadas pelos romanos no primeiro século sob o nome de "*calx*" (<http://www.webelements.com/calcium>).

O cálcio é quimicamente classificado como um dos elementos alcalinos terrosos, isto é, no Grupo 2 da tabela periódica e o quinto elemento mais abundante

na crosta terrestre, encontrado em diversos minerais, incluindo como calcário, gesso e fluoreto. As estalagnites e estalactites contêm carbonato de cálcio (CaCO_3), que é a base da indústria do cimento (LEE, 2001).

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, responsável por cerca de 1 a 2% do peso corporal e 99% é encontrado em dentes e ossos. O cálcio também se encontra associado com proteínas, participando da secreção de hormônios e neurotransmissores, adesão celular e função de proteínas do citoesqueleto. Além de seu papel na estrutura do organismo, o osso serve como reservatório de cálcio e fósforo visando à manutenção das concentrações normais no plasma e no fluido extracelular e também com importantes funções na contração muscular e coagulação sanguínea (COZZOLINO, 2005).

A presença da vitamina D é essencial na absorção de cálcio. Leite e seus derivados são as melhores fontes naturais de Ca, sendo que 75 a 89% da ingestão e absorção de todo o cálcio vêm destas fontes. (NICKEL et al., 1996). Outras fontes de Ca são vegetais, frutas, grãos, peixes, aves e carnes. A ingestão recomendada (DRIs) tem sido estabelecida em diferentes idades do indivíduo, variando entre 800 a 1300 mg dia⁻¹ (COZZOLINO, 2005). O ácido oxálico presente principalmente no espinafre, bata-doce e feijão é o inibidor mais potente da absorção de cálcio. Fitatos, a cafeína, o ferro e o zinco em altos níveis também podem interferir de forma negativa na absorção (JOVANÍ et al., 2001). A ingestão de sódio em altas concentrações apresenta bastante influência na perda óssea, liberando quantidades consideráveis de cálcio na urina. Em relação à solubilidade dos sais de Ca, a faixa de absorção de sais de acetato, lactato, gluconato, citrato e carbonato estão entre 25 a 40% e estes tem sido utilizados em suplementos. A deficiência deste metal pode causar osteoporose, hipertensão, raquitismo. E o excesso na ingestão de cálcio pode provocar insuficiência renal, síndrome da hipercalcemia e formação de pedras nos rins (FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996; COZZOLINO, 2005).

3.4 – Fósforo

O fósforo, da palavra grega "phosphorus" que significa "portador de luz" foi descoberto pelo alquimista Hennig Brand em 1669, na Alemanha. Era preparado a partir da destilação de uma mistura de urina e ureia na procura da pedra filosofal. A partir daí obteve-se um material branco que brilhava no escuro. Fósforo existe em várias formas, incluindo alotrópico branco e vermelho. O fósforo branco é extremamente venenoso e muito inflamável e o fósforo vermelho se inflama espontaneamente em presença de ar, porém não é tóxico (<http://www.webelements.com/phosphorus>).

Cerca de 90% do fósforo encontra-se nos ossos e o restante em processos metabólicos. Nos alimentos ocorre uma mistura de fósforo na forma inorgânica e orgânica e a função na dieta é participar do crescimento de tecidos e repor as perdas por excreção e pela derme, além da função de tampão em sistemas ácidos e alcalinos para manutenção do pH, armazenamento de energia provindo dos macronutrientes na forma de ATP e ativação das enzimas por fosforilação. O transporte de fósforo para sua absorção no duodeno se dá pelo transporte dos íons sódio. Na maior parte dos alimentos existe uma boa disponibilidade, com exceção de alimentos que contém grande teor de ácido fítico e ocorre em maior parte como estér de fosfato utilizado nos processo metabólicos. A ingestão recomendada para adultos é de 700 mg dia⁻¹, para crianças de 1 a 8 anos a faixa de ingestão é de 460 a 500 mg dia⁻¹ e de 9 a 18 anos é de 1250 mg dia⁻¹. A deficiência deste nutriente é rara, mas pode ser causada pela ingestão crônica de antiácidos baseados em alumínio, que inibem sua absorção, e pelo alcoolismo (COZZOLINO, 2005). Excesso no consumo de fósforo, relacionado a um baixo consumo de cálcio pode causar hiperfosfatemia e hipocalcemia, conduzindo à baixa densidade óssea e suscetibilidade para fraturas (CERKLEWSKI, 2005).

3.5 – A importância do leite

3.5.1 – Leite Bovino

O leite e seus derivados são conhecidos desde a pré-história, quando o homem domesticou alguns animais. Essa domesticação iniciou-se entre 10.000 e 6.000 a.C. (ALEIXO, 2000).

Na antiguidade, a necessidade de sobrevivência fez com que o homem identificasse a importância do leite e de pelo menos dois de seus derivados, a manteiga e o queijo, como importantes fontes nutricionais (LEITE et al., 2006).

Com o avanço da ciência tem sido possível melhorar a tecnologia da indústria de laticínios no Brasil. As modificações no processo de pasteurização do leite, a melhoria da qualidade do rebanho e a adoção de boas práticas de higiene, desde a ordenha até as diferentes etapas do processamento industrial, para obtenção dos produtos desejados, formam um conjunto que assegura leite e derivados de qualidade (LEITE et al., 2006).

O leite é fonte de macro e micronutrientes essenciais para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e constitui umas das principais fontes de proteínas de origem animal para jovens e humanos de todas as idades (PEREIRA, 2003). É também uma excelente fonte de cálcio, sendo que o consumo de um copo de leite (cerca de 250 mL) sustenta 32% da ingestão diária recomendada (IDR) deste mineral, essencial na composição dos ossos (BEHRENS e SILVA, 2004).

Todos os leites contêm proteínas específicas, gorduras designadas de fácil digestão. A maior parte contêm lactose, minerais, vitaminas e outros componentes que podem apresentar importantes funções. Os lipídios estão presentes em glóbulos emulsificadores recobertos com membranas. Proteínas em dispersão coloidal se apresentam na forma de micelas e quantidades de minerais e lactoses na forma de soluções (SILVA et al., 2001).

Conhecimentos sobre a estrutura e os componentes iônicos do leite são importantes para o entendimento das secreções, absorções de íons no trato gastrointestinal e seus efeitos. Por outro lado, cátions divalentes como cálcio, magnésio e zinco são distribuídos entre as estruturas e componentes protéicos de alta especificidade (JENSEN, 1995).

As proteínas do leite são precursoras de peptídeos bioativos, sendo um tópico bastante investigado na área da bioquímica para melhoramentos da saúde, de alimentos funcionais e para preparações farmacêuticas. As caseínas no leite podem formar complexos solúveis com minerais como cálcio, ferro e zinco em pH intestinal, os quais permitem o monitorando da biodisponibilidade (MIQUEL e FARRÉ, 2007).

As caseínas (CN) são fosfoproteínas ou peptídeos fosforilados obtidos por precipitação através da acidificação em pH 4,6 a uma temperatura de 20°C. Podem ser identificadas de acordo com suas estruturas primárias: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -CN. O termo proteínas do soro pode ser usado para descrever o grupo de proteínas do leite após precipitação das CN em pH 4,6 a 20°C e a β -Lactoglobulina (β -LG), α -Lactoalbumina (α -LA), soroalbumina (SA), e Imunoglobulina (Ig), caracterizam a maior parte dos componentes dessa fração (FARRELL et al., 2004).

A proteína total contida no leite bovino apresenta uma faixa de concentração de aproximadamente 30 a 35 g kg⁻¹, podendo também variar de 23 a 44 g kg⁻¹ (SILVA, 1997). As proteínas podem ser consideradas como a fração de grande destaque para compostos nitrogenados do leite, pois para o leite bovino, aproximadamente 95% desses ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não-protéicos. Em torno de 80% do nitrogênio protéico constitui-se de nitrogênio caseínico e 20% de nitrogênio não-caseínico. Diversos fatores influenciam a composição e a distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como: temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça, e alimentação (PEREIRA, 2003).

3.5.2 – Leite de Cabra

O leite de cabra apresenta baixo teor de colesterol, alto valor protéico, alta digestibilidade e altos teores de ácidos graxos. É recomendado para pessoas idosas, doentes, crianças e pessoas que apresentam alergia ao leite de vaca que pode ocorrer em crianças, sobretudo nos primeiros anos de vida (RIBEIRO e RIBEIRO, 2001). Seu grande valor nutritivo se deve a riqueza em proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais e a tolerância ao uso do leite de cabra se traduz positivamente quando a alergia às proteínas do leite de vaca se manifesta geralmente em sintomas gastrointestinais (BEDA, 2002).

Nos últimos anos tem sido observado aumento na procura e no consumo de leite de cabra e seus derivados, principalmente queijos. As quantidades de nutrientes presentes, além das proteínas, são satisfatórias do ponto de vista nutricional quanto ao cálcio, fósforo, tiamina (vitamina B₁), riboflavina (B₂), retinina (vitamina A) e niacina (B₃). Porém, apresenta-se deficiente quanto ao ferro, ácido ascórbico, calciferol, cobalamina, piridoxina e folato. Embora o leite de vaca e o leite de cabra apresentem variações quanto às proporções e tipos de proteínas presentes, a composição total em aminoácidos é bastante similar (PEREIRA, 2003).

As proteínas do soro do leite de cabra (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) são imunologicamente diferentes das do leite bovino, mas estudos mostram que cinco proteínas do leite de cabra são semelhantes às do leite bovino (k-caseína, β -caseína, α ₂-caseína, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). A β -caseína é a principal componente do leite de cabra (60% da proteína em relação a 30% no leite bovino) e a caracteriza em estudos de adulteração (MAYER, 2005; EGITO et al., 2006; VELOSO et al., 2002a).

3.5.3 – Leite de Ovelha

Atualmente a ovinocultura encontra-se difundida em praticamente todo o mundo, sendo uma das principais atividades econômicas de vários países, dentre os quais se destacam a Austrália e Nova Zelândia (MACEDO Jr., 2004).

A produção de leite em ovinos pode ser uma alternativa sustentável, de baixo investimento e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais. Atualmente, a utilização desta valiosa matéria-prima para a fabricação de derivados do leite, pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor. A composição química do leite ovino pode variar devido à influência de fatores como: raça, estágio de lactação, variação durante a ordenha, condições climáticas, alimentação, entre outros (SOUZA et al., 2005).

Segundo GUTIÉRREZ (1991) citado mais tarde por SOUZA et al. (2005), a maior quantidade de caseína, fosfatos e demais componentes ácidos da matéria seca faz com que o pH oscile entre 6,3 e 6,6, sendo um pouco mais ácido que os leites de cabra e vaca. Além disso, a gordura é um dos componentes mais importantes do leite de ovelha, pois tem função nutricional e influência as características físicas e organolépticas. Está presente no leite em forma de glóbulos,

e sua quantidade varia muito, dependendo da raça, alimentação, período de lactação, etc.

Com exceção de algumas situações de economias de subsistência em que o leite é consumido *in natura*, a maior parte do leite de ovelha obtido é transformado em queijo e, em menor escala, em iogurte. Mais concentrado que o leite de vaca e cabra, o leite de ovelha é indicado para a fabricação de queijos com aromas e sabores especiais, famosos e de alto valor comercial no mundo inteiro, como o Roquefort e o Gorgonzola (SOUZA et al., 2005).

A produção animal está estritamente relacionada com a nutrição, a qual depende basicamente de quatro fatores: exigências nutricionais, composição e digestibilidade dos alimentos e quantidade de nutrientes que o animal ingere (MACEDO Jr., 2004). Além da raça Santa Inês, outras raças de ovelhas como a Lacaune, Texel, Ilê de França, Corriedelle relacionadas à produção de leite foram avaliadas quanto à influência da qualidade do leite, quanto à alimentação com fibras, consumo de nutrientes, produção, composição do leite, estágio de gestação e lactação, entre outros (MACEDO Jr., 2004; BRITO et al., 2006; HÜBNER et al., 2007; SOUZA et al., 2005).

A origem da raça Santa Inês é devido ao cruzamento de ovelhas Morada Nova com carneiros Bergamásia, e por ser uma raça bem adaptada ao clima nacional, vem sendo a mais difundida no território brasileiro. São animais mais pesados e de maior porte que alcançam 40 kg de peso vivo aos seis meses; o peso corporal médio é de 80 a 100 kg, para os machos, e 60 a 70 kg, para as fêmeas. Produzem carne de boa qualidade e peles fortes e resistentes. As fêmeas são ótimas criadeiras e apresentam excelente capacidade leiteira (MACEDO Jr., 2004). Durante as primeiras semanas de vida, o desempenho dos cordeiros depende, em grande parte, da produção de leite das ovelhas. A condição nutricional no período pós-parto afeta diretamente a quantidade de leite produzida por ovelhas em lactação. Neste período, geralmente observa-se perda de peso das ovelhas, a qual depende da qualidade e quantidade de alimento disponível, assim como do número de cordeiros amamentados, de fatores ambientais e do potencial produtivo da ovelha (HÜBNER et al., 2007).

A quantidade de leite produzida e sua composição apresentam variações ocasionadas por diversos fatores, como espécie, raça, sexo, idade, finalidade produtiva, potencial genético, ambiente, balanço energético ou protéico,

alimentação, estação do ano, doenças, período de lactação, ordenhas (ALEIXO, 2000). No caso de animais em pastejo, as forrageiras tropicais apresentam quantidades ou equilíbrios inadequados de minerais e, por esta razão, a suplementação de macros (cálcio, fósforo, magnésio, enxofre, sódio, potássio e cloro) e microminerais (zinco, ferro, cobalto, cobre, manganês, iodo, selênio, molibdênio, flúor, níquel e crômio) torna-se extremamente importante para o processo produtivo. Nem todos os minerais citados estão em níveis deficientes e também há a existência das interações entre eles, algumas positivas e outras negativas, ou seja, o excesso de uns prejudica a absorção ou fixação de outros, por exemplo, os excessos de fósforo na dieta de ovinos, principalmente os confinados, também podem provocar cálculo urinário ou urolitíase obstrutiva. Em animais manejados em pastejo, a forma mais prática e adequada para evitar a ocorrência das deficiências nutricionais é a utilização dos suplementos mineralizados em cochos saleiros, de preferência cobertos, bem localizados nas pastagens e núcleos para rações.

As exigências de alguns minerais para ovinos (NRC 1985) como zinco, cálcio e fósforo são 20 – 33 mg kg⁻¹, 0,2 - 0,8% e 0,16 - 0,38%, respectivamente (<<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/documentos/Documentos65.pdf>>).

3.5.4 – “Leite” de Soja

O consumo de “leite” de soja tem aumentado no Brasil em função de novos produtos à base de extrato hidrossolúvel de soja, em combinação com sucos de frutas, que vêm sendo comercializados com sucesso no mercado nacional desde o final da década de 90 (BEHRENS e SILVA, 2004).

A soja, considerada alimento funcional, fornece nutrientes ao organismo e benefícios para a saúde. É rica em proteínas, contém isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de protease, fitosteróis, peptídeos com baixa massa molar, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados, que auxiliam na redução de riscos de doenças crônicas e degenerativas. Também constitui boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (PENHA, 2007).

A substituição do leite bovino pelo leite de soja contribui para a diminuição da gordura corporal e pode ser preparada para que tenha o mesmo teor de proteínas que o leite bovino. Entretanto, o valor biológico das proteínas de soja é inferior a das proteínas contidas no leite bovino, que apresenta como referência as proteínas do ovo, reconhecidas como as de maior valor biológico (BEHRENS e SILVA, 2004). Apesar disso, estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa. A ação da soja na prevenção do câncer ginecológico e alívio dos sintomas da menopausa são atribuídos às isoflavonas, compostos fenólicos heterocíclicos que podem atuar como agentes antiestrogênicos, competindo com estrógenos de origem endógena (como o 17 β - estradiol), cuja função biológica está ligada ao desenvolvimento de alguns tipos de cânceres ginecológicos (HASLER, 1998).

Uma das importantes características físicas das proteínas da soja é sua solubilização em água, contribuindo significativamente para uma propriedade funcional dos produtos da soja. Estudos de investigação do efeito da modificação das proteínas da soja com sulfito de sódio, bisulfito de sódio e cisteína em proteínas solúveis desse alimento mostraram que houve um aumento da intensidade das bandas protéicas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), identificando, assim, algumas proteínas da soja, como a glicinina e a β -conglucina (ABTAHI e AMINLARI, 1997; MA et al., 1997).

Alguns elementos traço presentes no leite de soja, como o ferro, zinco, cobre e manganês podem se apresentar como espécies de sulfatos, sendo que o elemento iodo se apresenta na forma de iodetos de K e Na (BRÄTTER et al., 1998). Outros autores demonstraram que cálcio, ferro e zinco apresentam biodisponibilidade no organismo, porém menor no leite de soja formulado do que no leite infantil formulado, observados em estudos *in vivo* e *in vitro*. Além disso, polipeptídeos de digestão de proteínas gastrointestinais são capazes de se ligar ao ferro e evitar a sua absorção como a fração da proteína conglucina, liberada na digestão da proteína de soja. Já para o cobre não há mudança na biodisponibilidade entre esses dois tipos de leite (JOVANÍ et al., 2001).

Os compostos de soja contêm também grandes quantidades de oligosacarídeos α -D-galactosil, como a rafinose e stachinose, os quais são indigestos pelos mamíferos, podendo causar fatores como flatulências. Assim,

estudos foram feitos incluindo fermentação com fungos, bactérias e enzimas para melhorar a acessibilidade dos oligosacarídeos α -D-galactosil no organismo (SAKAI et al., 1987).

3.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

No fim da década de 1950 e início dos anos 60 surgiu a eletroforese em gel de poliacrilamida, que permitiu o desenvolvimento das eletroforeses descontínuas que apresentam alto poder de resolução e ganhou grande importância na avaliação da homogeneidade de preparações protéicas obtidas, normalmente por sistemas cromatográficos (SILVA Jr., 2001).

A eletroforese é um processo de separação relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. As técnicas de eletroforese em gel descontínuas conduzidas em gel de poliacrilamida mostram, após revelação adequada, bandas bem estreitas de proteínas que conferem uma grande resolução entre elas. Este sistema é definido como descontínuo devido a três características diferenciadas: a porosidade dos géis, a composição química e o pH das soluções-tampão dos géis e reservatórios (parte anódica e catódica). No caso dos géis, um deles é chamado de gel concentrador ou de empilhamento, decorrente da manutenção de uma fronteira móvel finíssima, que é mantida graças a uma relação constante entre as concentrações de glicina e cloreto, onde se encaixam as proteínas (3-5% (m/v) de acrilamida), de poros mais largos e o outro de gel fracionador ou de separação (5-20% (m/v) de acrilamida) de poros menores que o anterior (SILVA Jr., 2001).

Alguns exemplos dos vários métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) mais empregadas são: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), eletroforese em gradiente de gel (PGE), eletroforese por focalização isoelétrica (IEF), eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), eletroforese em gel de poliacrilamida descontínua (DISC) (CHIOU e WU, 1999; SILVA Jr., 2001), e também eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia conhecida como UREA-PAGE (VELOSO et al., 2002a).

Uma das principais aplicações da técnica de eletroforese em gel contendo uréia é a diferenciação das proteínas de diversos tipos de leite (VAN

HEKKEN e THOMPSON, 1992), assim como também a detecção e a quantificação do soro de leite adicional em leite e bebidas, em que as soluções das amostras estavam em meio de uréia (SOUZA et al., 2000). Desta forma, essa técnica tem sido bastante utilizada em controle de qualidade como adulteração de leite.

EGITO et al. (2006) avaliaram métodos de eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) em presença de uréia (UREA-PAGE) e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para identificar a adulteração do leite de cabra pela adição de leite de vaca. UREA-PAGE foi o método mais apropriado para a identificação desse tipo de fraude, em decorrência da presença da caseína α_{s1} com migração mais rápida no leite bovino. O limite de detecção, a repetibilidade e o tempo para execução indicaram que esse método pode ser aplicado como rotina no controle de qualidade do leite de cabra recebido pelas indústrias.

Estudos de separação e quantificação das frações da caseína foram feitos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa (RP-HPLC) comparando com o método UREA-PAGE e os resultados obtidos nos dois métodos foram similares (VELOSO et al., 2002b). Em outros trabalhos, além desses métodos, também se utilizou a metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) (MAYER, 2005).

Em outro estudo de adulteração de leite de vaca ao leite de cabra, observou-se que a metodologia UREA-PAGE foi a mais aplicável, uma vez que permitiu uma diferenciação mais clara entre os perfis dos leites genuínos das espécies pesquisadas, além da maior rapidez e menor número de etapas analíticas (PEREIRA, 2003).

A investigação de espécies metálicas é indispensável para entender sua essencialidade, toxicidade e impactos bioquímicos em sistemas biológicos. A maioria desses íons metálicos está ligada a proteínas e enzimas específicas e mostram seus efeitos, como atividades ou centenas de estruturas das proteínas com diferentes conformações. Na literatura existem trabalhos de especificação de metais ligados a proteínas utilizando eletroforese em gel de poli-acrilamida com diversas técnicas analíticas para determinação de metais (GARCIA, et al., 2006). Uma revisão na literatura em estudos de metaloproteínas por eletroforese em gel mostra que essas técnicas correspondem a 17%, 7%, 33 e 43% para espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de fluorescência atômica (AFS),

espectrometria de raios-X (XRF) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), respectivamente (MA et al., 2004).

VERBI et al. (2005) investigaram bandas protéicas de callus (*Citrus sinensis* L. Osbeck) embriogênicos *in vitro*, usando fluorescência de raios-X com radiação micro-síncrotron (μ SR-XRF) depois da separação por SDS-PAGE. A quantificação da ligação de metais-proteínas foi feita depois da decomposição do gel por radiação microondas com cavidade, utilizando-se as técnicas de fluorescência de raios-X por reflexão total excitada com radiação síncrotron (SR-TXRF), espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de emissão óptica com chama (FAES). Foi possível observar que proteínas entre 81 e 14 kDa apresentam diferentes intensidades de ferro em diferentes posições e a análise da proteína de 53 kDa mostrou resultados mais interessantes. Além do ferro, foram indicadas as presenças de Ca, Cu, K e Zn em experimentos com μ SR-XRF. Cobre, K, Fe e Zn foram determinados por SR-TXRF, Mg por FAAS, Na por FAES e Ca por SR-TXRF e FAAS. Nas bandas de 81 e 14 kDa foi determinado Fe (105 e 21,8 $\mu\text{g g}^{-1}$) e nas outras bandas (86 a 14 kDa) foram determinados Ca, Cu, K, Mg, Na e Zn nas faixas de concentrações de 42,4 a 283; 0,91 a 15,9; 2,47 a 96,8; 2,01 a 4,59; 29,3 a 305 e 3,39 a 29,7 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Um estudo de caso feito por MAGALHÃES e ARRUDA (2007) investigou 11 procedimentos diferentes para extração de proteínas e metaloproteínas para castanhas (*Aescullus hippocastanum* L.) *in natura*. Depois de cada extração, a proteína total foi determinada e depois da separação das proteínas por SDS-PAGE, os metais pertencentes às estruturas protéicas foram mapeados por fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF). Depois de mapeados os elementos Cr, Fe e Mn em bandas protéicas (33 e 23 kDa), suas concentrações foram determinadas por GFAAS. Foram obtidos bons resultados com extração de proteínas combinando moagem e sonicação, porém, essa estratégia não preserva os íons metálicos na estrutura da proteína, mostrando que houve uma diminuição de 42% da concentração de Mn comparado com agitação em água (procedimento de referência). Por outro lado, usando moagem e agitação em meio tamponado, houve aumento significativo nos teores de Mn, quando comparado ao procedimento de referência.

Estudos seguintes avaliaram dois métodos de extração de proteínas da semente do feijão de soja com o objetivo de preservar a ligação do metal com

proteína após dois diferentes procedimentos de extração. As proteínas foram primeiramente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e então as bandas foram mapeadas por SR-XRF. Algumas bandas mapeadas foram decompostas por combustão assistida por microondas e Ca, Cu, K, Mg, Mn e Zn foram quantificados por ICP-MS ou ICP OES (SUSSULINI et al., 2007).

BINET e colaboradores (2003) usaram uma estratégia que envolve acoplamento de diferentes técnicas analítica, ligando eletroforese em gel com ablação em laser acoplado com espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (LA-ICP-MS) para detectar, mapear e quantificar metal ligado à proteína (zinco e cádmio) sintetizadas em *Escherichia coli*. Foi observada a indução da síntese da SmtA, uma proteína de baixa massa molar, com ligações de cátions de zinco e cádmio. Um perfil de Zn e Cd ligado às frações de proteínas obtidas do citoplasma de *E. coli* e um alto conteúdo de cada um desses metais foi obtido.

CHÉRY et al. (2006) apresentaram um método em que as proteínas de leveduras foram previamente separadas por SDS-PAGE, sendo realizada, em cada banda, a determinação de Se por vaporização eletrotérmica com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ETVICP-MS). A análise foi feita diretamente sobre o gel corado, o que torna o método ainda mais prático. As vantagens desse estudo foram alta resolução no fracionamento de proteínas e a simples quantificação de selênio.

SILOTO (2005) investigou espécies de Cu e Zn em água de coco e a influência de processo de pasteurização sobre essas espécies. Um dos estudos foi a separação das proteínas de água de coco por SDS-PAGE e a determinação do Cu por análise direta de sólidos em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (SS-GFAAS) e Zn por GFAAS. Os estudos foram semi-quantitativos e observou-se que o Cu estava associado às proteínas de 22,4 a 23,2 kDa, 27,6 kDa, 29,7 kDa, 36,8 a 39,6; 45,6 a 47,3 kDa; 42,5 a 47 kDa e que o Zn estava ligado às proteínas na faixa de 29,8 a 30,9 kDa e 36,8 kDa para as diversas amostras de coco não pasteurizadas. Após a pasteurização, o Cu se distribuiu mais uniformemente nas diferentes faixas de massas molares e o zinco, que se encontrava em proteínas de massas molares maiores, após processamento das amostras foi encontrado nas de menores massas protéicas.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Instrumentação

No preparo de amostras para determinação dos teores totais de zinco, cálcio e fósforo no leite e para a decomposição das bandas protéicas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, foi utilizado um forno com radiação microondas com cavidade (Multiwave, Anton Parr) contendo rotor com 6 frascos de polietileno modificado.

Os experimentos para os teores totais e para o método de digestão gastrointestinal *in vitro* foram efetuados usando a determinação simultânea de diversos minerais por ICP OES com visão radial (Varian, Vista RL, Mulgrave, Austrália).

Para pesagem das amostras estudadas foi utilizada uma balança analítica (OHAUS-Analytical Plus).

Espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS, Varian, modelo SpectrAA – 800) foi usado para determinação das concentrações de zinco em bandas protéicas.

Para a separação das proteínas das amostras de leite empregando eletroforese em gel de poliacrilamida foram utilizados mini-cuba e aparatos para eletroforese: placas de vidro e pentes (BioAmerica Inc. Equipments), potenciômetro (pH METER TEC-2) e centrífuga (Eppendorf – centrifuge 5417R).

Para a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* usou-se potenciômetro (pH METER TEC-2), banho-maria (Solab), mesa agitadora (Marconi) e membrana de diálise com tamanho de poros de 12000-16000 Da (Inlab).

Para a determinação da proteína total das amostras de leite foi utilizado espectrofotômetro (Femto, modelo 432).

4.2 – Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico e água deionizada a 18 MΩ cm em sistema Milli-Q® (Millipore) foram empregados para preparo das soluções, tais como ácido nítrico (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA) e peróxido de hidrogênio (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA), usados para as digestões das amostras

(teores totais) e para a mineralização das bandas protéicas. Para a mineralização da ração animal, além do ácido nítrico, foi usado o ácido perclórico (Impex).

As soluções estoque de zinco, cálcio e fósforo foram preparadas a partir da diluição de solução padrão comercial 1000 mg L⁻¹ (Teclab). Todas as soluções e curvas de calibração foram preparadas com HNO₃ 1% (v/v).

Para as determinações de zinco em GFAAS, o ácido nítrico utilizado foi subdestilado (destilador de ácido sub-ebulição, Marconi, Piracicaba, Brasil) e solução 1,78% m/v Mg(NO₃)₂ (Mallenckrodt) foi empregada como modificador químico. O branco utilizado nessas análises foi resultado da mineralização do branco do gel sem a banda protéica em HNO₃ 1% (v/v).

Os reagentes utilizados para a eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas foram TRIS (tris(hidroximetil)amino-metano) (Synth, SP Brasil), ácido clorídrico (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA), Uréia (J.T.Baker, Alemanha), acrilamida (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), N,N,N,N – metileno bisacrilamida(BIS), N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato de amônio e glicina (Sigma, Alemanha), 2-mercaptoetanol (Inlab, Brasil), azul de bromofenol (Merck), azul brilhante de Comassie R-250 (Sigma), ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹ (Quemis, Brasil), hidróxido de potássio 10 mol L⁻¹ e ácido tricloroacético (Synth), glicerina (Proquímios, RJ, Brasil) e metanol (Proquímios). O padrão protéico de massas molares conhecidas empregado na UREA – PAGE foi da GE Healthcare, de 14,4 a 97 kDa.

Os reagentes utilizados para a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* para as amostras de leite foram ácido clorídrico (Aldrich Chemical), pepsina (Vetec, Brasil), hidróxido de potássio (Chemco, Campinas SP, Brasil), pancreatina – Pancreatin from porcine pâncreas (Sigma Aldrich), sais de bile – Bile extract porcine (Sigma) e bicarbonato de sódio (Vetec).

Para a determinação da proteína total das amostras de leite foi utilizado o reagente Comassie Brilliant Blue G-250 (Pierce da marca Perbio) e como padrão de proteína albumina de soro bovino, BSA (Sigma).

4.3 – Descontaminação dos materiais

Todos os materiais utilizados no trabalho foram previamente lavados com detergente neutro e água corrente, abundantemente enxaguados com água

destilada e deixados em banho de HNO₃ 10 % (v/v) por no mínimo 24 h. A seguir, os materiais foram enxaguados com água ultrapura.

Todo o preparo de soluções e os procedimentos para o preparo dos géis de poliacrilamida e a corrida eletroforética foram feitos em capela de fluxo laminar para evitar problemas de contaminação, principalmente referentes ao elemento zinco.

4.4 – Amostras e materiais de referência certificados

As amostras estudadas foram leite bovino da raça Holandesa e leite de ovelha da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste e leite bovino integral UHT, leite de cabra integral UHT e “leite” de soja adquiridos no comércio local.

As amostras foram analisadas para a determinação da concentração total de zinco, cálcio e fósforo, estudos de separação das proteínas, estudos da digestão gastrointestinal simulada *in vitro* e determinação da proteína total.

Para verificar a exatidão do método proposto para determinação dos teores totais, os analitos foram determinados em amostra de referência certificada de leite (NIST 8435 – Whole Milk Powder), produzido pelo National Institute of Science and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).

Capítulo 5

Procedimento Experimental

5 – Procedimento Experimental

5.1 – Determinação dos teores totais

Os teores totais de zinco, cálcio e fósforo foram determinados nas amostras segundo procedimento previamente desenvolvido e descrito por SILVA et al. (2001), empregando forno com radiação microondas para mineralização das amostras. Basicamente, 2,5 mL das amostras de leite ou 250 mg de material certificado de referência (NIST 8435–Whole Milk Powder), foram utilizados na determinação. Assim, 1,0 mL de H₂O₂ (30% m/m) e 2,0 mL HNO₃ (50% v/v) foram utilizados nas digestões.

Após a digestão, as amostras foram diluídas para 20 mL com água deionizada e as concentrações de zinco determinadas por ICP OES. Abaixo, o programa de aquecimento utilizado no forno de microondas com cavidade (Tabela 5.1.1) e os parâmetros empregados na análise por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente – ICP OES (Tabela 5.1.2).

TABELA 5.1.1 - Programa de aquecimento empregado na digestão ácida assistida por radiação microondas

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	100	5
2	600	5
3	1000	5
4	0	15

TABELA 5.1.2 - Parâmetros empregados na análise por ICP OES

Parâmetros Instrumentais	ICP OES (visão radial)
Potência da rádio frequência	1,05 Kw
Vazão do nebulizador	0,60 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,50 L min ⁻¹
Nebulizador	V-Groove
Câmara de nebulização	Sturman Master
Altura de observação	8 mm
Comprimento de onda	Zn: 213, 857 nm Ca: 396, 847 nm P: 178, 222 nm

5.2 – Gel de Eletroforese

A eletroforese em gel de poli(acrilamida com uréia (4% de acrilamida para o gel de empilhamento e 10% para o gel de separação) foi realizada segundo método adaptado por ANDREWS (1983) e posteriormente descrito por PEREIRA (2003) com modificações.

Primeiramente, a mini-cuba de eletroforese de tamanho 10,0 cm (largura) x 8,5cm (altura) e as placas de vidro foram limpas com álcool e clorofórmio 1:1 (v/v). As placas de vidro foram montadas conforme instruções do fabricante, formando um “sanduíche” com as placas separadas pelos espaçadores.

Para a preparação do gel de separação a 10% foram adicionados 2,25 mL de Acrilamida/Bis 40% (m/v) (40g de acrilamida e 2g de N,N,N,N – metileno bisacrilamida (BIS) em 100 mL de solução) e 7,10 mL de tampão do gel de separação (6,43g de TRIS, 38,57g de uréia, 0,572 mL de HCl, com pH ajustado para 8,9 em 100 mL de solução). Essa mistura foi filtrada em papel-filtro e em seguida foi acrescentado 30 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) (0,5 g de persulfato de amônio em 4,5 mL de água deionizada) e 10 µL de TEMED. Aplicou-se a mistura desses volumes vagarosamente, no interior de cada uma das placas até aproximadamente 0,5 cm da parte inferior do pente. Procedeu-se a preparação de

um gel de cada vez e aplicou-se, aproximadamente, 0,5 mL de água deionizada com auxílio de uma seringa com agulha para que ocorresse a formação de um filme líquido sobre a superfície do gel para se evitar o contato do mesmo com o O₂ do ar, que pode interferir na polimerização e também não formar bolhas, que podem surgir durante a etapa de aplicação. Aguardou-se 40 minutos para a completa polimerização do gel.

A seguir, foi preparado o gel de empilhamento, preparado da seguinte maneira: foram misturados 0,39 mL de acrilamida/Bis e 3,52 mL de tampão do gel de empilhamento (0,830 g de TRIS, 30 g de uréia, 0,44 mL de HCl, com pH ajustado para 7,6 em 100 mL de solução). Então, filtrou-se em papel-filtro a mistura e em seguida, adicionou-se 30 µL de persulfato de amônio e 5 µL de TEMED. Colocou-se os pentes e aguardou-se novamente 40 minutos para a completa polimerização.

Posteriormente, os pentes foram retirados com cuidado e onde os dentes dos pentes estavam encaixados formaram-se pequenas cavidades (poços), as quais foram usadas para a aplicação das alíquotas das amostras.

A solução de tampão de corrida (3,75 g de TRIS, 18,25 g de glicina em 250 mL de solução e em seguida diluída 5 vezes) foi colocada cuidadosamente nos poços com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, essa mesma solução foi retirada de cada poço através de uma seringa. Assim, o gel estava pronto para a aplicação das amostras.

Para o preparo das amostras foram dissolvidos 30 µL dos diferentes tipos de leite em 1,0 mL de tampão da amostra (0,375 g de TRIS, 24,5 g de uréia, 0,2 mL de HCl, 0,35 mL de 2-mercaptoetanol e 0,075 g de azul de bromofenol em 50 mL de solução). Após dissolução, as amostras foram submetidas a banho-maria a 40 °C por 1 hora e centrifugadas em temperatura de 5 °C, por 10 minutos a 10000 g. O aquecimento na presença de 2-mercaptoetanol e uréia foram necessários para a desnaturação das proteínas. O reagente 2-mercaptoetanol atua como agente redutor, quebrando as ligações dissulfídricas presentes em grande parte nas proteínas. Isso se torna necessário para facilitar o acesso do desnaturante às partes internas das proteínas, além de permitir a separação de cadeias polipeptídicas mantidas por esta ligação covalente (SILVA Jr., 2001).

Em seguida, aplicou-se 30 µL do sobrenadante nos poços da eletroforese em gel UREA-PAGE.

Volumes restantes de tampão de corrida ou eletrodo foram vertidos dentro da cuba, na parte interna e externa. A tampa do conjunto foi encaixada, atentando para a conexão dos eletrodos e os fios destes ligados à fonte. Depois de seguir os procedimentos citados acima, aplicou-se uma voltagem de 90 V e amperagem de 23 a 24 mA por 4 horas e 30 min. A finalização da corrida foi indicada pela linha frontal que migra à frente das proteínas e formada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra. Dessa forma, quando a linha frontal estava ao final do gel fracionador, foi desligada a fonte elétrica.

Para a revelação das bandas no gel, essas foram coradas em solução de azul brilhante de Comassie (0,5 g de azul brilhante de Comassie e 3,75 mL de H₂SO₄ em solução total de 500 mL). Em seguida, após repouso overnight (cerca de 12 horas), essa solução foi filtrada em papel filtro e misturada ao filtrado, na proporção 9+1, 55,6 mL de 10 mol L⁻¹ de KOH e 66,67 g de ácido tricloroacético 12% (m/v). Finalmente, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em glicerol 10% (v/v) e metanol 10 % (v/v) em solução total de 100 mL.

A Figura 5.2.1 representa um esquema da separação de proteínas no gel de UREA-PAGE e a Figura 5.2.2 mostra como foi montado o sistema de eletroforese.

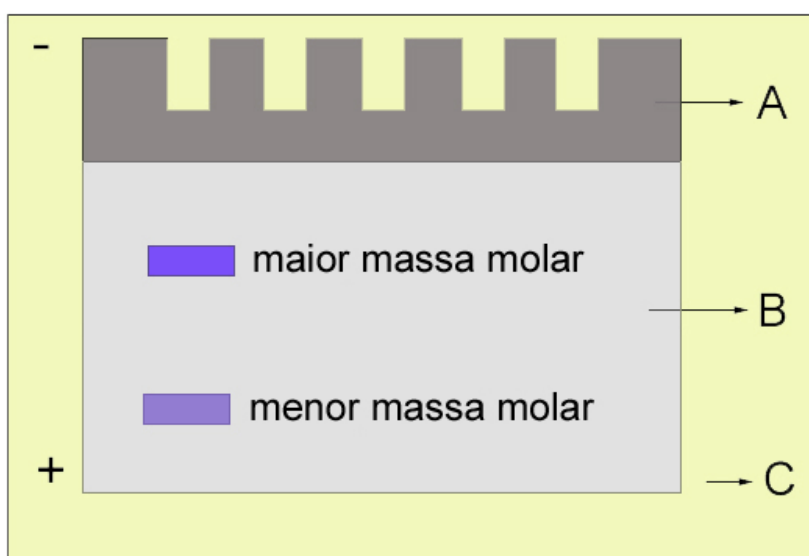


FIGURA 5.2.1 – Esquema da separação de proteínas por UREA-PAGE: (A) Gel de empilhamento, (B) Gel de separação e (C) Tampão de corrida ou eletrodo

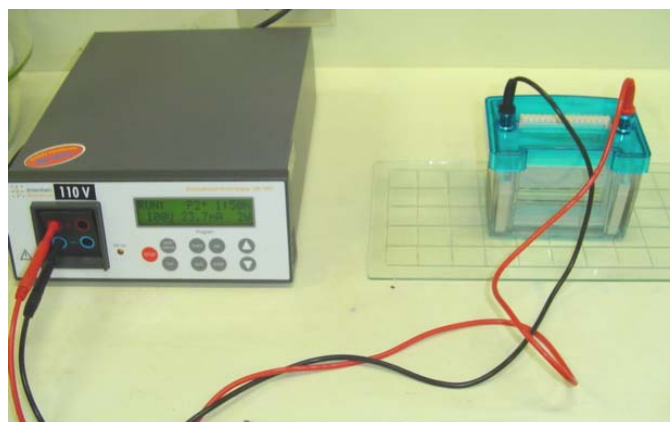


FIGURA 5.2.2 – Sistema de eletroforese utilizado na separação das proteínas

5.3 – Estimativa da Massa Molar das Proteínas

Para se obter uma primeira estimativa das massas molares das proteínas dos leites bovino da raça Holandesa e leite de ovelha da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste e leite bovino integral UHT, leite de cabra integral UHT e “leite” de soja separadas por UREA-PAGE, foi utilizado padrão de proteínas conhecidas. A preparação dos padrões foi feita da seguinte maneira: o conteúdo de um frasco (560 µg) do padrão das proteínas foi diluído em 200 µL de solução tampão de amostra. A seguir, foram submetidos a aquecimento a 40 °C em banho-maria durante uma hora e aplicados 10 µL em um dos poços do gel. A Tabela 5.3.1 mostra as proteínas presentes no padrão e as suas respectivas massas molares.

TABELA 5.3.1 - Padrões protéicos com diferentes massas molares

Proteína	Massa molar (kDa)
Fosforilase b	97
Albumina	66
Ovoalbumina	45
Anidrase Carbônica	30
Inibidor Tripsina	20,1
α – Lactalbumina	14,4

A estimativa das massas molares foi feita utilizando uma curva do logaritmo do padrão molecular das proteínas *versus* mobilidade relativa (Rf) após a separação das proteínas por UREA-PAGE. Na equação 1 pode ser observado como foi realizado o cálculo de Rf.

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pela proteína}}{\text{distância percorrida pela linha frontal}} \quad (\text{Equação 1})$$

Os cálculos do Rf e das bandas protéicas das amostras de leite foram feitos utilizando-se o programa LabImage 1D 2006 Professional.

5.4 – Determinação de zinco em bandas protéicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite

Para determinar o zinco nas bandas protéicas das diferentes amostras de leite, essas foram cortadas com o auxílio de uma faca de plástico descontaminada em 10% (v/v) HNO₃. O mesmo processo foi realizado para o branco (definido como uma região do gel, em que não existia banda protéica). As dimensões de cada banda foram de aproximadamente 8 mm de largura por 3 a 5 mm de altura.

Depois de cortadas, as bandas foram lavadas com água deionizada e secas em papel filtro por 15 minutos em uma capela de fluxo laminar. Posteriormente, cada uma das bandas foi pesada diretamente em uma balança analítica. As massas pesadas foram entre 20 e 50 mg e em seguida, colocadas em um mini-frasco de Teflon®. Adicionou-se 75 µL de HNO₃ 65% v/v subdestilado e 75 µL de H₂O₂ 30% m/m conforme procedimento descrito por ARAÚJO (2004).

Após a transferência, os mini-frascos abertos foram introduzidos nos frascos de PTFE do forno com radiação microondas com cavidade, que continha 2 mL de água deionizada através de uma pinça. Os 2 mL de água foram adicionados para a absorção de energia microondas excedente, não entrando em contato com o interior dos recipientes que continham as amostras. A Figura 5.4.1 apresenta as dimensões do recipiente utilizado (mini-frasco) e o programa de aquecimento

utilizado para a digestão das bandas protéicas (gel de poliacrilamida) está descrito na Tabela 5.4.1.

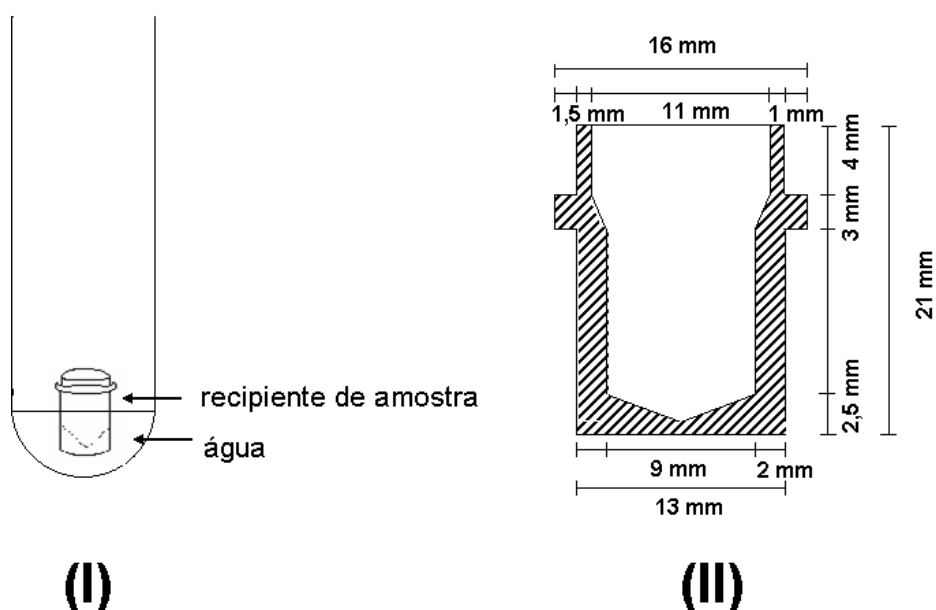


FIGURA 5.4.1 - (I) esquema do recipiente de amostras dentro do frasco do forno microondas com cavidade, (II) corte transversal do recipiente de amostras.

TABELA 5.4.1 - Programa de aquecimento para digestão das bandas protéicas empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	250	1
2	0	1
3	250	5
4	400	5
5	750	10
6	0	10

Após digestão, as amostras foram transferidas para frascos tipo “Falcon” de 15 mL, sendo os volumes ajustados com água deionizada para 3,5 mL.

Dessa forma, o elemento Zn foi determinado por GFAAS, sendo levantadas curvas de pirólise e atomização introduzindo-se 18 µL de solução padrão na concentração de 0,3 µg L⁻¹ de Zn em presença do branco da amostra (gel sem banda) em meio 1% v/v HNO₃ e 5 µL de modificador químico 1,78% m/v Mg(NO₃)₂.

O comprimento de onda utilizado foi 213,9 nm, a resolução espectral de 1,0 nm e a corrente da lâmpada de 5 mA.

A curva analítica de calibração foi feita a partir de solução padrão 1000 mg L⁻¹ de Zn, contendo uma faixa de concentração de 0,5 a 3,0 µg L⁻¹ de Zn⁺² em presença do branco da amostra com acidez 1,0 % v/v HNO₃.

5.5 – Estudos da bioacessibilidade *in vitro* para zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite

A bioacessibilidade do zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite estudadas foi determinada com o emprego de procedimento *in vitro* desenvolvido por MILLER et al. (1981). O experimento baseou-se na simulação da digestão gastrointestinal com pepsina-HCl durante a fase gástrica e sais de bile-pancreatina na fase intestinal. A solução de pepsina foi preparada dissolvendo 16 g de pepsina em 100 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução de pancreatina e sais biliares foi preparada pela dissolução de 0,5 g de pancreatina e 3,13 g de extrato de bile em 125 mL de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹.

Adicionou-se 40 mL de cada amostra de leite em duplicata e ajustou-se o pH para 2 com solução de HCl 2 mol L⁻¹ e em seguida 6,4 mL de pepsina em meio 0,1 mol L⁻¹ de HCl e agitou-se em banho-maria a 37 °C a 127 rpm durante 2 horas. Essa etapa simula a digestão do alimento que ocorre no estômago. Após esta etapa, cada amostra de 40 mL do digerido de pepsina foi separada em duplicatas de 20 mL, sendo uma delas utilizada para o procedimento de titulação e a outra para a diálise.

Para o procedimento de titulação, 5 mL de solução de pancreatina e sais de bile foram adicionados nos 20 mL do digerido de pepsina de cada amostra e, em seguida, titulou-se as amostras com 0,5 mol L⁻¹ de solução de KOH até aproximadamente pH 7,5 para simular o valor de pH encontrado no meio do intestino de um indivíduo. Anotou-se o volume de KOH utilizado na titulação. Esse volume de KOH anotado foi utilizado para a preparação de NaHCO₃ e, assim, colocado dentro da membrana de diálise. Dessa forma, o interior da membrana de diálise deve estar em meio tamponado (NaHCO₃) para que, durante o processo de diálise, não ocorra mudança brusca de pH e precipitação das proteínas.

A diálise é uma técnica empregada na diferença de concentrações com uma força motriz para separar partículas grandes de partículas pequenas, por exemplo, as proteínas dos sais. Uma solução mais concentrada é colocada de um lado da membrana e uma solução menos concentrada do lado oposto (LEHNINGER, 1976).

Primeiramente, para o preparo da membrana de diálise de porosidade de aproximadamente 12 – 16 kDa, essa foi imersa em água deionizada por 10 minutos para hidratação.

Colocou-se, então, o volume variando aproximadamente de 3 a 6 mL, dependendo do tipo de leite, para cada amostra da titulação anterior, de solução 0,5 mol L⁻¹ NaHCO₃ e o volume foi ajustado com água deionizada para 25 mL. A seguir, colocou-se essa solução dentro da membrana de diálise e esta foi fechada cuidadosamente nas duas extremidades da membrana de diálise.

A membrana foi colocada dentro de um Becker em contato com a amostra digerida com pepsina, o Becker foi coberto e levado ao banho-maria por 30 minutos a 37 °C e com 127 rpm de agitação. Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução de pancreatina e sais de bile, juntamente com a amostra e a membrana de diálise. O Becker foi coberto e novamente colocado em banho-maria sob agitação a 127 rpm a 37 °C durante 2 horas (MUNIZ-NAVEIRO et al., 2006; MILLER, 1981; WHITTAKER et al., 1989).

Após este tempo, o conteúdo das membranas foi retirado e o dialisado foi analisado por ICP OES. As condições de análise do ICP OES estão na Tabela 5.1.2.

Na equação 2 pode ser observado como foi realizado o cálculo da porcentagem do elemento (E) dialisado.

(Equação 2)

$$\% \text{ de E dialisável} = \frac{\text{E dialisado (mg/L)} \times \text{volume dialisado (25 mL)}}{\text{E total (mg/L)} \times \text{volume inicial da amostra (20 mL)}} \times 100$$

5.6 – Determinação das proteínas totais nas diferentes amostras de leite

Para a determinação total de proteínas nas diversas amostras de leite estudadas foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este é um método espectrofométrico que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Esse corante, conhecido como reagente de Bradford, se complexa com as proteínas presentes na amostra conferindo propriedade absorvente a elas em comprimento de onda de 595 nm.

A calibração do espectrofotômetro foi realizada com soluções padrão de albumina de soro bovino – BSA, utilizando uma faixa de concentração de 50 a 250 mg L⁻¹ a partir de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹.

O procedimento consistiu na adição de 1,25 mL do reagente de Bradford com 100 µL das soluções de padrão de BSA ou das amostras estudadas. Em seguida, esperou-se 5 minutos e os valores das absorbâncias foram obtidos em comprimento de onda de 595 nm. Esse procedimento foi realizado para 3 replicatas da mesma amostra.

5.7 – Determinação de zinco, cálcio e fósforo nas rações dadas como alimento da raça Santa Inês

Existem alguns métodos de decomposição de amostras orgânicas e biológicas, sendo um dos mais utilizados os métodos de decomposição por via úmida. Este método implica no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de mistura de ácidos oxidantes ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Após aquecimento, as amostras são oxidadas deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriados para análise, se os ácidos forem suficientemente oxidantes, e se o aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado (KRUG, 2008).

Neste trabalho, o procedimento utilizado para determinação de zinco, cálcio e fósforo em amostras de ração animal utilizou a mistura nítrico-perclórica. Pesou-se 500 mg de amostra de ração animal, em seguida, adicionou-se 6,0 mL da mistura de ácido nítrico/perclórico na proporção 4:1 e a decomposição ocorreu em

bloco digestor a uma temperatura de aproximadamente 200 °C. Após a digestão, os volumes foram ajustados com água deionizada para 50 mL.

A determinação dos nutrientes foi feita por ICP OES e o valor de 95% da matéria seca foi corrigido nas concentrações obtidas. As condições de operação do ICP OES são os mesmos descritos na Tabela 5.1.2 e os comprimentos de onda utilizados foram 213,857 nm para Zn, 396,847 e 422,673 nm para Ca e o comprimento de onda de 213,618 nm para P.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6 – Resultados e Discussão

6.1 – Determinação dos teores totais

A composição química e a determinação dos teores de minerais no leite são importantes para o entendimento da influência fisiológica na nutrição humana e animal e a toxicidade dos elementos traço (BULDINI et al., 2002). Devido à complexidade desse tipo de matriz, com a presença de muitos compostos orgânicos, várias abordagens usando digestões apropriadas, como digestões assistidas por radiação microondas foram estudadas para determinar o conteúdo total de espécies inorgânicas em amostras de leite (SILVA et al., 2001).

Para a determinação dos teores totais de zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite, primeiramente utilizou-se digestão assistida por radiação microondas com cavidade, conforme descrito no item Procedimento Experimental. Adicionou-se 2,5 mL dos diferentes tipos de leite, 1,0 mL de H_2O_2 (30% m/m) e 2,0 mL HNO_3 (50% v/v). Após a digestão, as amostras foram diluídas para 20 mL de água deionizada e determinadas por ICP OES (SILVA et al., 2001). Essa técnica foi escolhida em função de sua característica multielementar e ampla faixa linear (VANDECASTEELE e BLOCK, 1993).

A eficiência de digestão usando ácidos diluídos na decomposição de compostos orgânicos deve-se à ação do HNO_3 formando NO gasoso, removido do meio reacional e que reage com o O_2 presente na fase gasosa. Em seguida, o NO_2 é gerado e reabsorvido na solução, formando NO_3^- e NO . Esse ciclo de reações se repete até que não exista mais a presença de O_2 gasoso. A geração de soluções com menor acidez é conveniente, quando se utilizam métodos que empregam sistemas de nebulização para a introdução dos digeridos e previnem a ocorrência de danos aos equipamentos. A adição de moléculas de água ao sistema microondas é, em função da alta capacidade calorífica da água, o que facilita o aquecimento. Pode prevenir também tanto a formação de sais insolúveis, que poderiam ser formados com o emprego de HNO_3 concentrado, como elevadas pressões e temperatura em sistemas com cavidade, agindo como um amortecedor. Além disso, utilização de ácidos diluídos diminui resíduos, custos, contaminação e valores do branco analítico (KRUG, 2008).

O programa de aquecimento utilizado em microondas com cavidade está indicado na Tabela 5.1.1 e os parâmetros empregados na análise por ICP OES estão presentes na Tabela 5.1.2.

Os resultados dos elementos químicos em estudo, zinco, cálcio e fósforo, estão apresentados nas Tabelas 6.1.1, 6.1.2 e 6.1.3, respectivamente.

TABELA 6.1.1 - Teores totais de zinco nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 213,857$ nm, *n=3, **mg kg⁻¹.

Amostras de leite	Zinco (mg L ⁻¹)*
Bovino integral UHT	3,42 ± 0,03
Soja	2,66 ± 0,07
Cabra	3,22 ± 0,02
Ovelha "in natura"	2,76 ± 0,01
Bovino integral "in natura"	3,44 ± 0,05
M.R.	30,53 ± 0,36**

M.R. - Material de Referência - NIST 8435 para Zn = 28 ± 3,1 mg kg⁻¹

TABELA 6.1.2 - Teores totais de cálcio nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 396,847$ nm, *n=3, **mg kg⁻¹.

Amostras	Cálcio (mg L ⁻¹)*
Bovino integral UHT	1074 ± 6
Soja	153 ± 5
Cabra	1121 ± 8
Ovelha "in natura"	1671 ± 5
Bovino integral "in natura"	955 ± 10
M.R.	10408 ± 645**

M.R. - Material de Referência - NIST 8435 para Ca = 9220 ± 490 mg kg⁻¹

TABELA 6.1.3 - Teores totais de fósforo nas diferentes amostras de leite em comprimento de onda $\lambda = 178,222 \text{ nm}$, *n=3, **mg kg⁻¹.

Amostras	Fósforo (mg L ⁻¹)*
Bovino integral UHT	854 ± 1
Soja	324 ± 9
Cabra	1144 ± 18
Ovelha "in natura"	1575 ± 44
Bovino integral "in natura"	709 ± 1
M.R.	8604 ± 666**

M.R. - Material de Referencia - NIST 8435 para P = 7800 ± 490 mg kg⁻¹

Os resultados obtidos para os elementos zinco e cálcio em leite bovino se encontram na mesma faixa de concentração obtida por outros autores, tais como DE LA FUENTE et al. (1995) e SILVA et al. (2001) e GAUCHERON (2005).

O mesmo ocorreu com o fósforo, cujos teores obtidos estão de acordo com trabalho de GAUCHERON (2005). Também para os três elementos em leite de cabra, de ovelha e bovino demonstrados em RAYNAL-LJUTOVACA et al. (2008) e GÜLER (2007). Para o "leite" de soja, no extrato solúvel, valores similares aos obtidos neste trabalho para cálcio e fósforo foram observados por PENHA et al. (2007) e para zinco (MOMCILOVIC et al., 1976).

Como esperado, os maiores valores encontrados foram para o elemento cálcio, pois é o nutriente mais abundante no leite, seguido do fósforo. Esses dois nutrientes estão bastante relacionados, apresentando uma razão Ca/P normalmente constante e importante na dieta. O Zn, dentre os micronutrientes presentes no leite, é o que apresenta uma maior concentração. Também se apresenta importante na nutrição humana e animal, associado às moléculas orgânicas e na forma de sais inorgânicos. No caso de aminoácidos como a histidina e a metionina, além de fosfatos e ácidos orgânicos, ajudam na biodisponibilidade deste elemento (SCHEPLYAGINA, 2005). Além disso, esses três elementos estão de certa forma associados a uma das mais importantes proteínas do leite, a caseína, sendo que no leite bovino o Zn formaria o complexo Zn-caseína-Ca-P (MICHALKE, 2003).

Com base nos resultados obtidos para o material de referência certificado e comparando com os valores de referência - $28 \pm 3,1 \text{ mg kg}^{-1}$, $9220 \pm 490 \text{ mg kg}^{-1}$, $7800 \pm 490 \text{ mg kg}^{-1}$ - respectivamente para zinco, cálcio e fósforo, foi realizado o teste *t*-student não pareado (BARROS et al., 2001). Deve ser observado que os valores apresentados pelo material de referência se referem à matéria seca, razão da disparidade aparente entre os valores, pois o leite apresenta aproximadamente 90% de teor de água.

Assim, os três elementos em estudo ficaram a um nível de 95% de confiança, não apresentando diferenças significativas entre os resultados obtidos e os valores certificados. Desta forma, pode-se confirmar a exatidão do método de decomposição e determinação para ICP OES.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados considerando-se as medidas da razão do sinal analítico / sinal de fundo (SBR) e a concentração do analito que produz um sinal líquido (altura de pico) equivalente à intensidade do sinal de fundo (BEC). As equações envolvidas foram deduzidas conforme sugerido por THOMSEN et al. (2000). O BEC e o SBR são calculados pelas fórmulas:

$$\text{SBR} = \frac{I_{\text{sr}} - I_{\text{branco}}}{I_{\text{branco}}} \qquad \text{BEC} = \frac{C_{\text{sr}}}{\text{SBR}}$$

Onde, C_{sr} é a concentração da solução de referência mais concentrada, I_{branco} é a intensidade de emissão do branco analítico e I_{sr} é a intensidade de emissão da solução de referência mais concentrada.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) são calculados aplicando-se as fórmulas e considerando-se o BEC:

$$\text{LOQ} = \frac{10\text{BEC} \times \text{RSD}}{100} \qquad \text{LOD} = \frac{3\text{BEC} \times \text{RSD}}{100}$$

Onde RSD é o desvio padrão relativo para 10 medidas da solução do branco analítico.

Os limites de detecção e quantificação para os elementos Zn, Ca e P estão apresentados na Tabela 6.1.4 e os resultados encontrados estão de acordo com VIEIRA (2007), que otimizou as condições do equipamento (ICP OES), as quais foram utilizadas neste trabalho.

TABELA 6.1.4 – Valores dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os elementos zinco, cálcio e fósforo.

Elementos	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Zn ($\lambda = 213,857$ nm)	0,02	0,06
Ca ($\lambda = 396,847$ nm)	0,22	0,74
P ($\lambda = 178,777$ nm)	2,10	7,01

6.2 – Gel de Eletroforese

Primeiramente, foram realizados testes com eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE para a separação das proteínas do soro do leite. O soro do leite foi submetido a ultracentrifugação e injetado no gel SDS – PAGE (10% de concentração do gel). Observou-se que não houve separação alguma entre as proteínas.

A seguir foi testado e utilizado o método UREA-PAGE somente com algumas amostras de leite, ou seja, sem os padrões de proteína. A eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia (4% de acrilamida para o gel de empilhamento e 10% para o gel de separação) foi realizada segundo método adaptado por ANDREWS (1983) e posteriormente descrito por PEREIRA (2003) com modificações. Porém, houve alguns problemas de polimerização e volume adequado das soluções para a preparação do gel, pois neste trabalho foi utilizado outro tipo de cuba eletroforética (mini-cuba). Assim, os volumes foram modificados conforme descrito na parte experimental e realizado um novo experimento.

A definição quanto aos volumes dos reagentes utilizados na polimerização do gel de poliacrilamida (10%) com uréia possibilitou a separação das proteínas das amostras de leite. O volume dos reagentes fixados para preparação do gel de separação a 10% foram: 2,25 mL de acrilamida/BIS 40% (m/v); 7,10 mL de tampão do gel de separação; 30 μ L de persulfato de amônio e 10 μ L de TEMED. E para a preparação do gel de empilhamento: 0,39 mL de acrilamida/BIS 40% (m/v); 3,52 mL de tampão do gel de separação; 30 μ L de persulfato de amônio e 5 μ L de TEMED.

A Figura 6.2.1 mostra os géis de eletroforese obtidos para cada uma das amostras de leite. A figura apresenta colunas numeradas de 2 a 6, as quais correspondem às bandas protéicas estudadas de cada uma das amostras. Na coluna 1 são apresentadas as bandas do padrão que contêm proteínas conhecidas (de 14,4 a 97 kDa). Os retângulos tracejados representam as bandas estudadas com as respectivas massas molares aproximadas, pois esta é uma análise qualitativa, de cima para baixo, 52 e 39 kDa para o “leite” de soja (coluna 2), 32 e 24 kDa para leite de ovelha *in natura* (coluna 3), bovino integral UHT (coluna 4), 32 kDa para leite de cabra integral UHT (coluna 5) e bovino integral *in natura* (coluna 6).

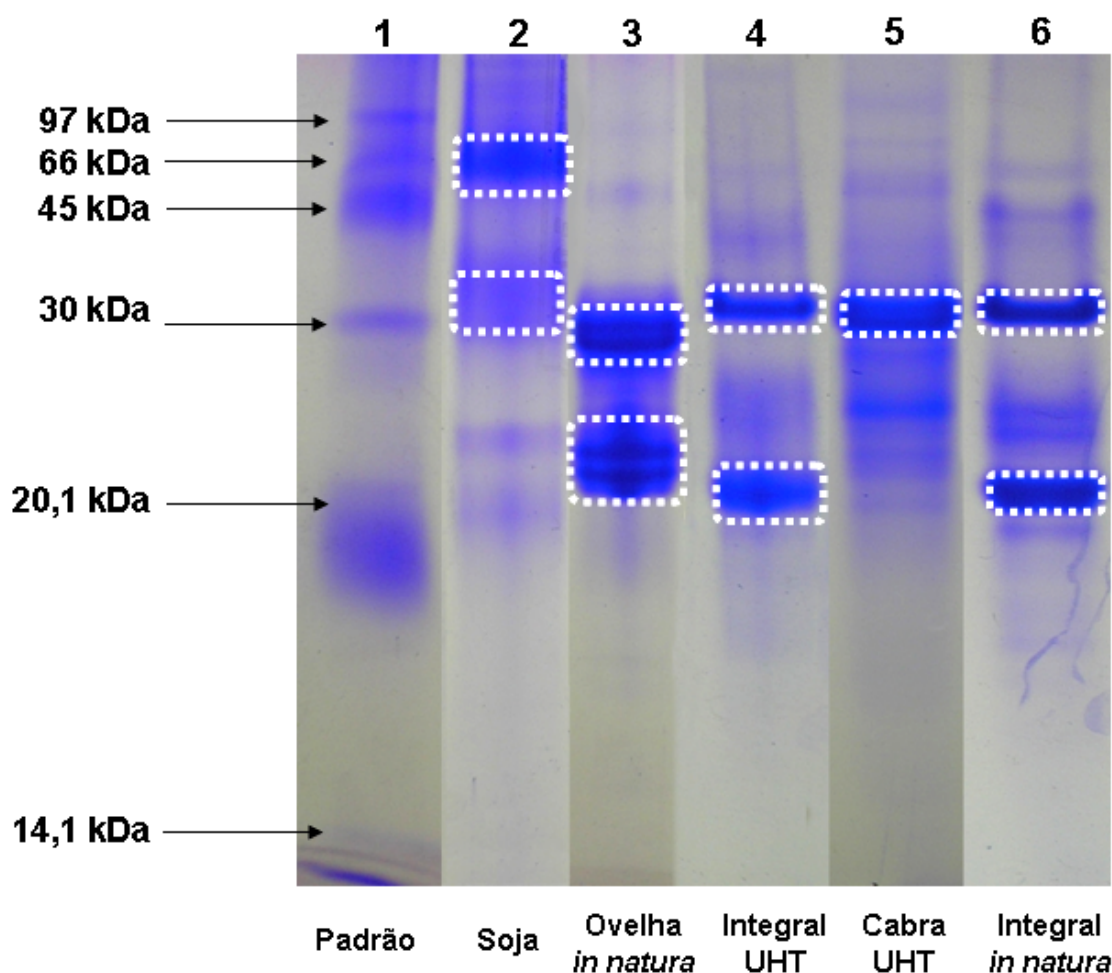


FIGURA 6.2.1 – Imagem do gel de poliacrilamida (10%) com uréia de amostras de “leite” de soja (coluna 2), leite de ovelha *in natura* (coluna 3), leite bovino integral UHT (coluna 4), leite de cabra integral UHT (coluna 5) e leite bovino integral *in natura* (coluna 6).

A eletroforese em gel UREA-PAGE foi realizada separadamente para cada uma das amostras para evitar problema de contaminação e cada uma delas em 3 replicas.

De acordo com dados do padrão molecular das proteínas e de suas mobilidades relativas (Rf) foi possível gerar uma curva entre Log de cada padrão molecular (Log PM) *versus* Rf. Por meio desta curva foi possível obter uma equação da reta. Esta equação foi utilizada para estimar as massas molares das proteínas separadas das amostras de diferentes tipos de leite. Na Figura 6.2.2 é apresentada a equação gerada e o coeficiente de correlação (R).

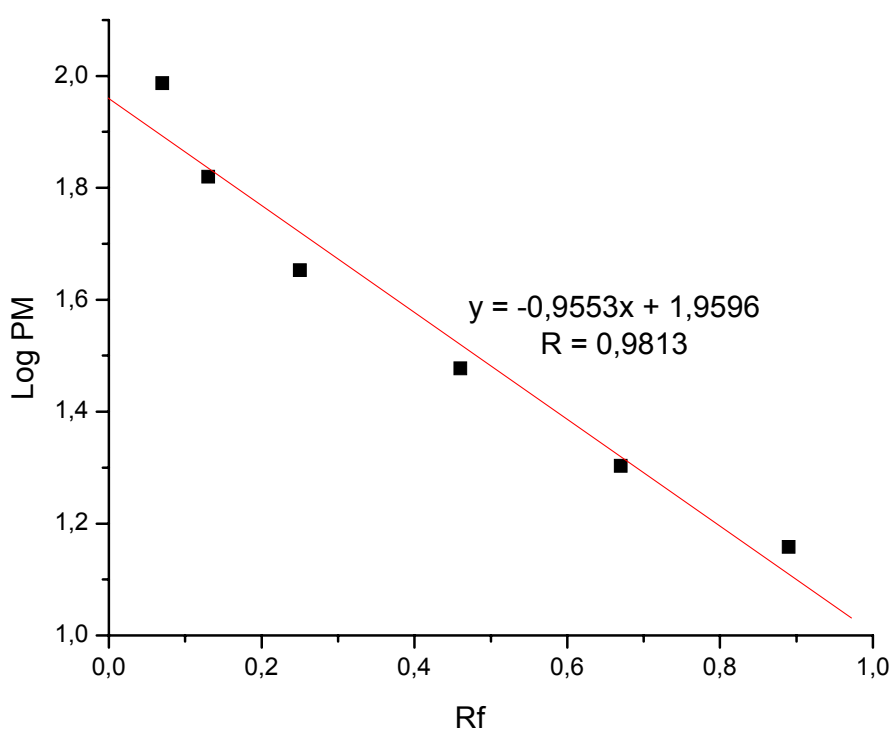


FIGURA 6.2.2 – Curva de calibração para gel de poliacrilamida (10%) com uréia gerada pela plotagem do Log de cada padrão molecular de proteína (Log PM) *versus* mobilidade relativa (Rf).

Os géis utilizados neste trabalho apresentaram concentrações de 4,0% (m/v) para o gel concentrador e 10% (m/v) para o gel fracionador. Essa combinação permitiu separar as bandas protéicas dos diferentes tipos de leite. O diâmetro do poro do gel está diretamente ligado ao mecanismo de separação das proteínas e essa propriedade está relacionada com a concentração de acrilamida (monômero)/bis-acrilamida (agente de ligação cruzada) (SILVA Jr., 2001).

Apesar de não se utilizar padrões das caseínas α e β , os perfis dos géis de ovelha *in natura* (EGITO et al., 2006), bovino integral UHT, bovino integral *in natura*, de cabra integral UHT (PEREIRA, 2003) e de soja (ABTAHI e AMINLARI, 1997) apresentaram perfis condizentes com a literatura. As α -caseínas estão na faixa de aproximadamente 23 kDa, e nos resultados obtidos, incluindo os cálculos feitos utilizando o programa de eletroforese, foi observada banda de aproximadamente 24 kDa. A β -caseína, apresenta-se em torno de 25 kDa (PEREIRA, 2003). Nos resultados obtidos neste trabalho as bandas de maior intensidade para os leites de ovelha *in natura*, bovino integral UHT, bovino integral *in natura*, de cabra integral UHT foi na faixa de massa molar de 32 kDa.

Assim, pode-se afirmar que as bandas protéicas observadas podem ser considerados representativos das caseínas mencionadas. É possível verificar também que as bandas de 32 e 24 kDa apresentam-se mais intensas, indicando maior abundância dessas proteínas.

Com relação ao leite bovino integral *in natura* e ao bovino integral UHT, verificou-se similaridade entre as bandas de caseínas presentes nas duas amostras, não apresentando modificação dessas proteínas em função do processo de pasteurização do leite.

Para o “leite” de soja, as bandas estudadas neste trabalho foram as de 52 e 39 kDa. Na literatura foram feitos estudos com separação das proteínas da soja em SDS-PAGE e relatada uma faixa de massa molar de aproximadamente 42 a 53 kDa, onde pôde-se encontrar subunidades da proteína β -conglucina e na faixa de 37 a 42 kDa, apresentam-se ácidos polipeptídicos de glicina (ABTAHI e AMINLARI, 1997; REN et al., 2009).

Dessa forma, pode-se concluir que a proteína obtida de 52 kDa pode ser uma subunidade de β -conglucina e a de 39 kDa condiz com ácidos polipeptídicos de glicina.

Em quaisquer das técnicas desnaturantes que podem ser utilizadas em eletroforese, a migração eletroforética observada refere-se às cadeias polipeptídicas de uma determinada proteína (SILVA Jr., 2001). Assim, neste estudo como exemplo pode-se citar as caseínas, pois quando estas são quebradas, formam os chamados peptídeos fosforilados (CPPs) codificados em α_{s1} - α_{s2} - e β -caseínas e que podem também formar complexos solúveis com minerais como cálcio, ferro e zinco (MIQUEL e FARRÉ, 2007). No caso da soja, 80% das proteínas extraídas são a β -

conglucina (7S) e a glicina (11S) e quando desnaturadas pelo aquecimento ocorrem interações entre essas proteínas, que podem formar subunidades básicas de 11S, β -subunidades de 7S e α -, α' -subunidades de 7S (REN et al., 2009).

6.3 – Determinação de zinco em bandas protéicas empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite

As bandas protéicas das diferentes amostras indicadas na Figura 6.2.1 foram cortadas com o auxílio de uma faca de plástico descontaminada em 10% (v/v) HNO_3 . Depois de cortadas, as bandas foram lavadas com água deionizada e secas em papel filtro durante 15 minutos em uma capela de fluxo laminar. As massas pesadas foram entre 20 e 50 mg e em seguida decompostas conforme descrito no item Procedimento Experimental. Com o programa de aquecimento descrito na Tabela 5.4.1 não se notou partícula ou solução turva a olho nu nas soluções decompostas. Dessa forma, foi possível o emprego das bandas de proteínas decompostas para a determinação dos teores totais de zinco nas proteínas dos diferentes tipos de leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS).

A utilização do GFAAS como técnica analítica de determinação elementar requer que o programa de aquecimento seja otimizado para que as ótimas temperaturas de pirólise e atomização sejam encontradas. A pirólise é uma etapa de separação térmica para a remoção de concomitantes sem perdas do analito por volatilização e a atomização é a etapa de aquecimento rápido para gerar uma nuvem atômica mais densa e posterior leitura do sinal analítico (VANDECASTEELE e BLOCK, 1993). A Figura 6.3.1 mostra as curvas de temperaturas de pirólise e atomização usando $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em presença do branco da amostra (gel sem banda) 1% v/v HNO_3 e 5 μL de modificador químico 1,78% m/v $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

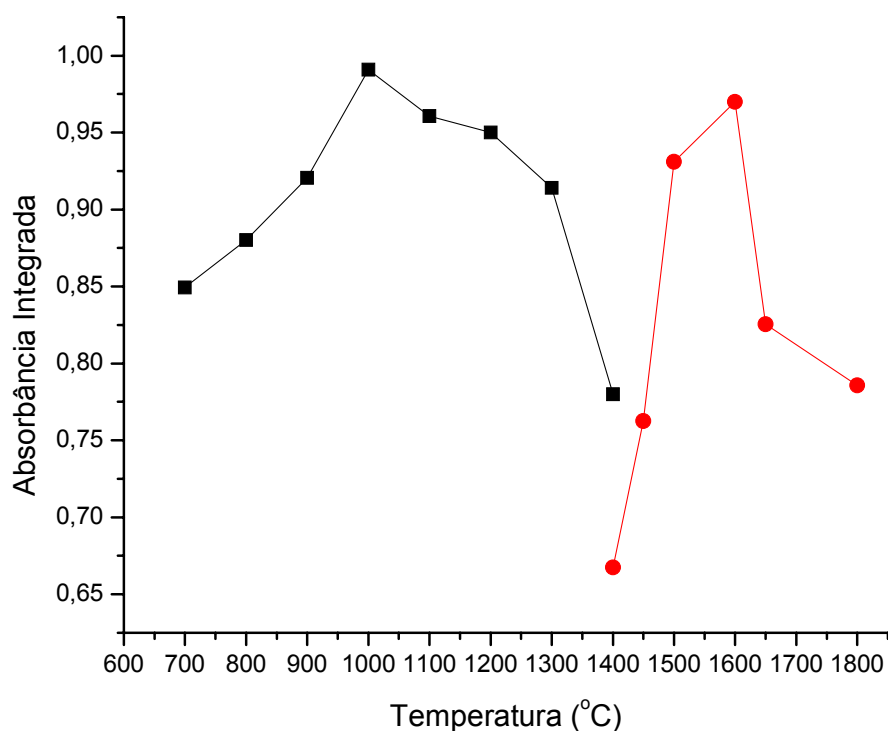


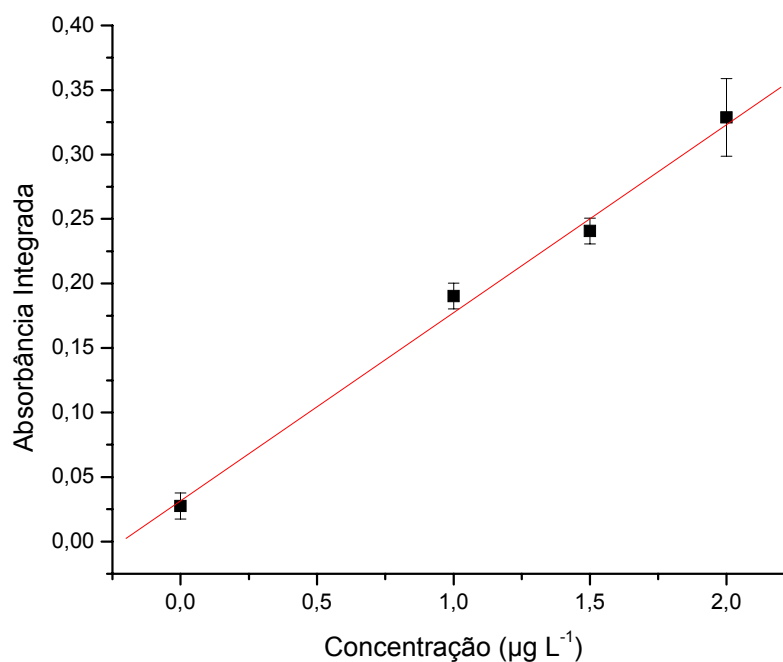
FIGURA 6.3.1 – Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em presença do branco da amostra (gel sem banda) 1% v/v HNO_3 . (■) Curva de Pirólise e (●) Curva de Atomização. Modificador utilizado: 1,78% m/v $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

A máxima temperatura de pirólise obtida sem perdas de Zn foi de 1000 °C e a melhor sensibilidade na atomização foi obtida a 1600 °C (DE LA FUENTE et al., 1995). Nessas temperaturas foram observados os melhores perfis dos sinais analíticos de absorbância com os menores desvios entre as medidas. O desvio padrão relativo (RSD) obtido foi em torno de 3,0% (n=3).

Após a otimização do método, o programa de aquecimento utilizado para a determinação da concentração total de Zn nas bandas protéicas das diferentes amostras de leite está apresentado na Tabela 6.3.1. A Figura 6.3.2 mostra a curva analítica de calibração de Zn obtida em meio do branco da amostra (pedaço do gel de poliacrilamida sem a banda protéica).

TABELA 6.3.1 – Programa de aquecimento otimizado para a determinação de Zn por GF AAS.

Etapa	T (°C)	Tempo (s)	Fluxo (L min ⁻¹)	Leitura
Secagem	85	2,0	3,0	Não
Secagem	95	8,0	3,0	Não
Secagem	120	10	3,0	Não
Pirólise	1000	5,0	3,0	Não
Pirólise	1000	1,5	3,0	Não
Pirólise	1000	2,0	0	Não
Atomização	1600	0,8	0	Sim
Atomização	1600	2,9	0	Sim
Limpeza	2500	2,9	3,0	Não

FIGURA 6.3.2 – Curva analítica para Zn em meio do branco da amostra (gel sem banda) 1% v/v HNO₃. ($y = 0,1457 x + 0,0316$; $R = 0,995$).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o elemento Zn foram calculados utilizando 10 medidas do branco analítico. Para o cálculo do LOD e do LOQ foram utilizadas as equações 3 e 4, respectivamente. E na Tabela 6.3.2 encontram-se os valores de LOD e LOQ.

$$\text{LOD } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{3 \times \sigma}{a} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{LOQ } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{10 \times \sigma}{a} \quad (\text{Equação 4})$$

σ = desvio padrão de 10 medidas do branco analítico

a = coeficiente angular da curva de calibração

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para determinação de Zn por GFAAS, utilizando-se as condições otimizadas, foram 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados obtidos na distribuição do zinco em bandas protéicas foram semi-quantitativos, sendo possível obter informações das concentrações aproximadas de Zn entre as bandas protéicas das diferentes amostras de leite. Os resultados obtidos estão indicados na Figura 6.3.3 onde as bandas (amostras) estão indicadas com suas faixas de massas molares e essas estão relacionadas às bandas selecionadas na Figura 6.2.1

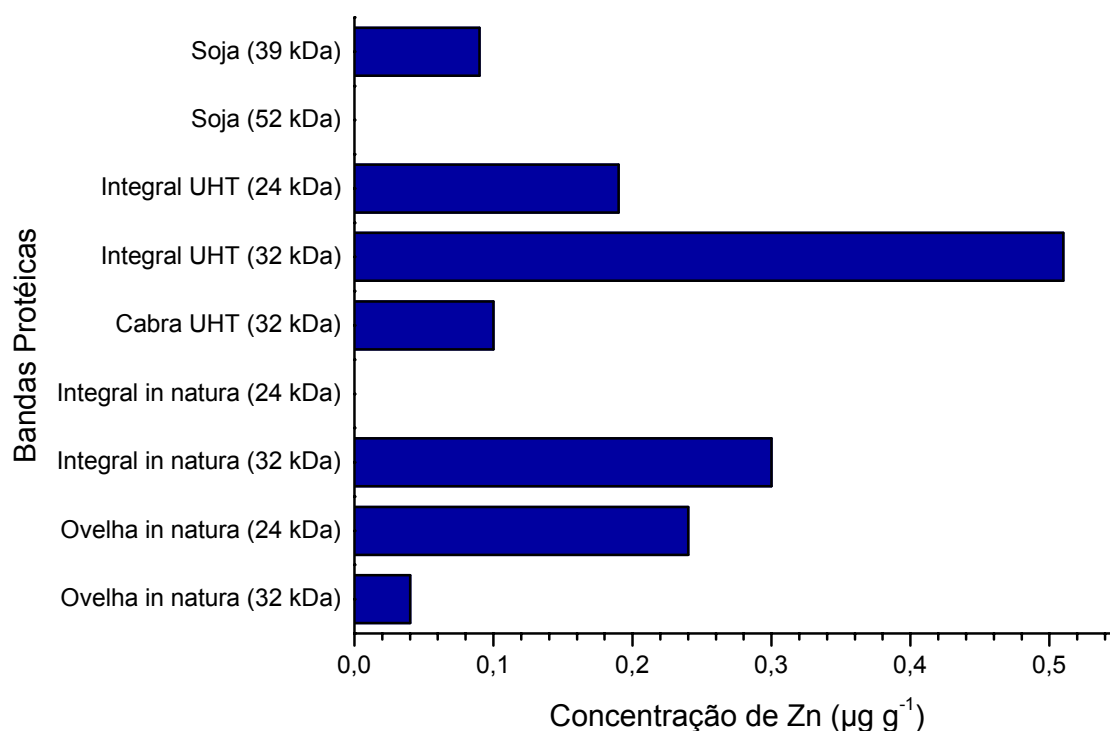


FIGURA 6.3.3 – Resultados da distribuição de Zn nas bandas proteicas das amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, cabra integral UHT, bovino integral UHT e “leite” de soja.

A principal classe de proteínas na maioria das espécies é a caseína. Ocorre como um complexo coloidal de proteínas e sais, principalmente os sais de cálcio. Quando o cálcio coloidal é removido, as submicelas α_{1-} , α_{2-} , β - e κ -caseínas são produzidas e fosforiladas em diferentes níveis. Essas micelas são suscetíveis a ação de enzimas proteolíticas. As ligações peptídicas da caseína podem ser quebradas com a ação das enzimas proteolíticas, produzindo cadeias de peptídeos solúveis ou aminoácidos solúveis, dependendo do grau da hidrólise. Soluções com baixos valores de pH podem também produzir mudanças na estrutura secundária, terciária e quaternária da caseína (MIQUEL e FARRÉ, 2007; SILVA et al., 2001). No trabalho de SILVA e colaboradores (2001) também foi possível observar que Ca, Mg e Zn estavam principalmente associados com o fosfato de cálcio coloidal nas micelas da caseína.

Os resultados apresentados na Figura 6.3.3 mostram que o elemento Zn está presente predominantemente, às proteínas do leite bovino integral UHT na faixa de massa molar de 32 kDa seguida da de 32 kDa do leite bovino integral (*in*

natura) e ovelha (*in natura*) na banda 24 kDa, que apresentaram teores similares de Zn. Na Tabela 6.3.2 estão indicados os valores percentuais de Zn obtidos nas proteínas estudadas em relação à concentração total de Zn encontrada no leite.

TABELA 6.3.2 – Valores percentuais da distribuição de Zn nas bandas protéicas das amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, cabra integral UHT, bovino integral UHT e “leite” de soja.

Amostras	Zn (%)	Zn total (mg L ⁻¹)
Soja (52 kDa)	0	
Soja (39 kDa)	3,4	2,66 ± 0,07
Integral UHT (32 kDa)	15	
Integral UHT (24 kDa)	5	3,42 ± 0,03
Cabra UHT (32 kDa)	3	3,22 ± 0,02
Integral <i>in natura</i> (32 kDa)	9	
Integral <i>in natura</i> (24 kDa)	0	3,44 ± 0,05
Ovelha <i>in natura</i> (32 kDa)	1,4	
Ovelha <i>in natura</i> (24 kDa)	9	2,76 ± 0,01

De acordo com a Tabela 6.3.2 a porcentagem de Zn foi de 15% e 5% para o leite bovino integral UHT nas bandas protéicas de 32 e 24 kDa, respectivamente. Para o leite bovino integral (*in natura*) foi encontrado, para a banda de 32 kDa, 9% de Zn. No caso da banda de 24 kDa para essa amostra, não foi possível encontrar este elemento.

Para a amostra ovelha *in natura* foi possível estimar a provável ligação à proteína de 24 kDa, 9% de Zn e na de 32kDa, 1,4%. No “leite” de soja em torno de 3% na banda de 39 kDa, não sendo possível observar a presença de Zn na proteína de 52 kDa. Em leite de cabra integral UHT, para a banda estudada de 32 kDa foi possível encontrar em torno de 3% de Zn presente. Assim, pode-se observar uma possível ligação do Zn a essas proteínas, as quais podem ser consideradas como proteínas de metais ligantes.

Quanto a diferença entre o processo de pasteurização e o leite bovino integral *in natura*, não houve grandes diferenças entre as estimativas da ligação Zn-proteínas, apresentando as maiores concentrações deste elemento na banda de 32 kDa para as duas amostras de leite. Porém, a maior proporção encontrada na banda

de 32 kDa foi no leite bovino integral UHT (15%). Isso também foi observado em estudos de fracionamento no leite materno para Zn ligado a caseína. Nas amostras de leite processadas houve uma mudança significativa da distribuição relativa de zinco, com diminuição na fração do soro e aumento na fração de gordura. Com relação à caseína, não houve uma diferença significativa na porcentagem de zinco, embora houvesse uma tendência para o seu aumento em amostras processadas (GÓES et al., 2002).

BLAKEBOROUGH et al. (1983) apresentaram em um de seus estudos que o zinco também poderia estar ligado a caseína e as frações α -caseína e β -caseína em leite bovino. Essas, após ultracentrifugação, foram colocadas na coluna de Sephadex resultando em dois picos que continham zinco, o que demonstrou que 95% do zinco estava ligado a micelas da caseína, conhecidas por apresentar altas massas molares e subunidades de 20 a 30 kDa. As frações das misturas complexas de α – k – caseína e α – β – caseína apresentaram quantidades significativas de zinco ligado, conforme também se pode demonstrar neste trabalho.

Em trabalho de revisão, GAUCHERON (2005) discute que os grupos fosfato de resíduos de fosfoserina constituem os principais sítios ligantes de cátions nas caseínas e a capacidade de cátions se ligarem aos componentes da caseína pode diminuir na seguinte ordem: $\alpha_2 > \alpha_1 > \beta > k$ -caseína, que corresponde à sua diminuição no conteúdo de fosfoserina. Em trabalho anterior, GAUCHERON et al. (1997) estimaram a ligação de cátions em β -caseína com a seguinte ordem de afinidade: ferro > zinco > cálcio. O zinco foi encontrado com 3 CPP (caseínas fosfopeptídicas) e na fração que contém a α -caseína e, apesar da ausência dos clusters S(P)S(P)S(P)EE em suas estruturas, os 3 CPPs contém aminoácidos (ácido glutâmico, serina e fosfoserinas), comprovando a formação de complexos com zinco. Foi reportado que 6 íons de Zn^{+2} podem se ligar por molécula de CPP e que o complexo Zn-CPP contém seis moléculas de CPP por complexo. Desta forma, 100 g de fosfopeptídeos podem fixar 5 g de Zn (MIQUEL e FARRÉ, 2007). Além do zinco, o cálcio também poderia estar ligado a CPP derivadas da α_1 -CN e α_2 -CN e o ferro estaria ligado a CPP em β -CN(15-34)4P presente na seqüência do grupo S(P)S(P)S(P)EE (MIQUEL et al., 2005).

Além disso, a distribuição do zinco entre caseína, soro e outros componentes ligados ao zinco podem ser afetadas pelo pH, aquecimentos e concentração de outros cátions na dieta (PABÓN e LÖNNERDAL, 2000). No caso do

“leite” de soja, a desnaturação e modificação das características físico-químicas das duas principais proteínas de soja, glicina e β -conglucina, ocorre durante processamentos de alta pressão (JUNG et al., 2008). Uma vez que as proteínas são desnaturadas devido à transformação, a sua capacidade de se ligar ao zinco é provavelmente reduzida (PABÓN e LÖNNERDAL, 2000). Isso pode ser explicado pelas porcentagens de Zn encontradas nas bandas. Assim, algumas diferenças de resultados podem ocorrer.

Trabalho recentemente publicado salienta os problemas relacionados à análise de metaloproteínas empregando eletroforese em gel (CHÉRY et al., 2006). Por ser um processo moroso e que pode colocar em risco a estabilidade da espécie, devem ser tomadas algumas precauções para garantir a qualidade da separação para que não ocorra uma imagem totalmente errada da distribuição dos elementos traço. No entanto, os autores afirmam que embora problemas de contaminação ou conversão de espécies não possam ser ignorados, a eletroforese em gel é uma importante ferramenta para o fracionamento ou separação de compostos de alta massa molar, tais como as metaloproteínas. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam essa afirmação.

As determinações semi-quantitativas por GFAAS, com separação prévia das proteínas do leite por UREA-PAGE, utilizando 2-mercaptoetanol, foram úteis para avaliar a distribuição de Zn nas frações de proteínas reduzidas. Além disso, foi possível a definição de procedimento mais adequado para a preparação dos géis de poliacrilamida, assim como os procedimentos de preparo e determinação das diferentes amostras de leite estudadas.

6.4 – Estudos da bioacessibilidade *in vitro* para zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite

Do ponto de vista nutricional, é de grande interesse conhecer os teores de zinco, cálcio e fósforo no leite e as frações desses elementos que podem ser absorvidas ou utilizadas, ou seja, a sua biodisponibilidade. A biodisponibilidade pode ser considerada em relação a quatro processos que consiste em ingestão, bioacessibilidade (solubilidade), absorção, e primeira passagem no fígado. Após a ingestão, o processo de bioacessibilidade representa a fração do elemento, que é liberada a partir de matrizes alimentares e está disponível para a absorção no trato

gastrointestinal. A abordagem ideal seria a de avaliar minerais biodisponíveis para os seres humanos, porém esses estudos são, em geral, demorados e até impraticável para aplicações em grande escala (VELASCO-REYNOLD et al., 2008). Os métodos *in vitro* constituem uma boa alternativa para os métodos *in vivo* na avaliação da biodisponibilidade de nutrientes, sendo assim, os mais estudados.

Métodos *in vitro* são geralmente baseadas na simulação de digestão gastrointestinal, seguida pela determinação da quantidade de um determinado elemento solúvel ou dialisado através de uma membrana de certo tamanho dos poros (ROIG et al., 1999a; CÁMARA et al., 2005).

Os peptídeos fosforilados (CPPs) codificados em α_{s1} - α_{s2} - e β -caseínas podem formar complexos solúveis com minerais como cálcio, ferro e zinco em pH intestinal, modulando sua biodisponibilidade que agem como minerais solúveis ou transportadores, conhecidos como caseínas fosfopeptídicas (CPPs) e pode ser liberada durante a digestão enzimática de produtos derivados do leite ou durante alguma transformação (MIQUEL e FARRÉ, 2007). Com isso, pôde-se avaliar a biacessibilidade de zinco, cálcio e fósforo nas diferentes amostras de leite.

A Figura 6.4.1 mostra os valores em porcentagem de Zn absorvido, considerado em relação ao Zn que passou pelo poro da membrana de diálise, nas diferentes amostras de leite. Para os cálculos das porcentagens dos elementos dialisados foi utilizada a equação 2 apresentada no procedimento experimental, sendo todos os experimentos realizados em duplicata.

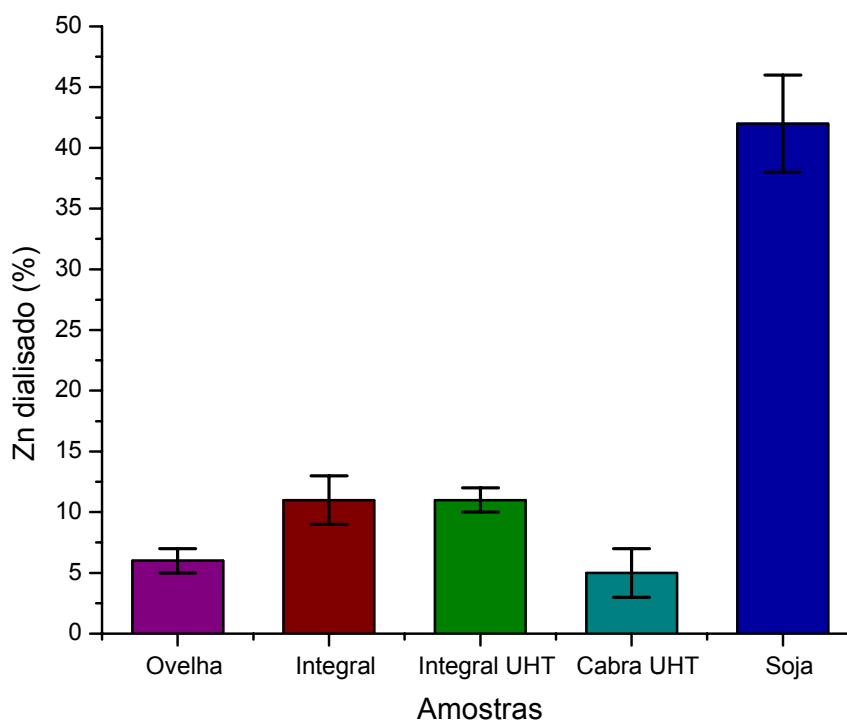


FIGURA 6.4.1 – Resultados do Zn dialisado pelo método de digestão gastrointestinal *in vitro* nas amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral UHT, cabra integral UHT e “leite” de soja.

Com relação ao teor total de zinco nas diferentes amostras de leite apresentado na Tabela 6.1.1, obteve-se para os leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral UHT e de cabra integral UHT as porcentagens do elemento zinco de $6 \pm 1\%$, $11 \pm 2\%$, $11 \pm 1\%$ e $5 \pm 2\%$, respectivamente, que passaram pela membrana de diálise.

Os valores das porcentagens do Zn dialisado obtido neste estudo para as amostras de leite de bovinos foram similares aos observados por PERALES et al. (2006) quando foi aplicado o método de digestão *in vitro*.

Em estudos com amostras não fortificadas com cálcio, o teor de zinco absorvido foi em torno de $14 \pm 1\%$. Por outro lado, em amostras com maiores quantidades de cálcio (fortificadas) os teores de Zn dialisado se restringiram à faixa de 7 a 8%. Isso pode ser explicado pelo efeito negativo de cálcio sobre a porcentagem do zinco na diálise devido a um efeito concorrencial na passagem através de membrana de diálise, ou seja, quanto maior o teor de cálcio, maior será esse efeito (PERALES et al., 2006). Dessa forma, nos resultados obtidos neste

trabalho, apesar das amostras aqui estudadas não serem fortificadas com cálcio, pode-se observar também uma menor porcentagem de zinco dialisado para leite de ovelha e leite de cabra, provavelmente em função dos maiores teores de cálcio presentes nessas amostras.

A maioria do zinco absorvido após centrifugação, para leites de caprinos e ovinos (91,6% em leite de ovelha e 87,5% em leite de cabra) foram encontradas na fração micelar. A caseína é o principal ligante do zinco em leite de ovelha, cabra e bovino. Como resultado desta distribuição, a biodisponibilidade de zinco é maior em leite humano devido ao zinco estar largamente ligado a moléculas de citrato na fração solúvel (DE LA FUENTE et al., 1997). Também pode ser observado em estudos *in vitro* que quanto a biodisponibilidade de zinco, SHEN et al. (1995) encontraram valores mais elevados para o leite humano (15%), valores mais baixos para o leite de ovinos (1,0%) e valores médios em amostras de leite de cabra e de bovino, resultados similares aos aqui observados em relação às amostras de leite de ovinos e bovinos.

HARZER e KAUER (1982), em estudos *in vitro* sobre a ligação do zinco-proteínas do leite bovino para determinar a influência da disponibilidade deste metal, observaram que em valores de pH levemente alcalino, 1 mg de caseína está ligada a 8,4 µg de zinco. No meio ácido do estômago, zinco é liberado a partir de caseína e absorvido no duodeno. Para recém nascidos, a absorção de zinco pode diminuir ainda mais devido à presença de zinco ligado a fosfopeptídeos resultante da ação enzimática da tripsina e quimotripsina na caseína (HARZER e KAUER, 1982; PABÓN e LÖNNERDAL, 2000). Portanto, diferenças na conformação e saturação da caseína com zinco e outros elementos, além de diferentes condições experimentais e procedimentos de diversos trabalhos sobre esse tema relacionados aos métodos *in vitro* e *in vivo*, podem explicar algumas diferenças observadas em relação aos estudos propostos para avaliar a absorção do zinco (PABÓN e LÖNNERDAL, 2000).

No caso do “leite” de soja foi observada a maior porcentagem de zinco dialisado, cerca de $42 \pm 4\%$. Desde que a proteína da soja contém ácido fítico que interfere na absorção do zinco, produtos alimentícios a base de soja são freqüentemente considerados como pobres fontes de zinco disponível (JOVANÍ et al., 2001; LÖNNERDAL et al., 1984). Apesar disso, estudos da biodisponibilidade de zinco em ratos (*in vivo*) mostraram resultados similares aos observados neste trabalho. Para uma fórmula a base de soja, experimentos *in vivo* apresentaram cerca

de $39,5 \pm 9,3\%$ de zinco biodisponível (JOHNSON e EVANS, 1978). Assim, a mera presença de proteína de soja em produtos alimentares não pode ser utilizada como o único critério para avaliar o valor nutritivo do alimento em relação ao zinco. A biodisponibilidade de zinco em fórmulas à base de soja e outros alimentos pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo os processos de transformação, fontes de proteínas e outros componentes das fórmulas nutricionais. Porém, os mesmos autores observaram elevada absorção também em amostras de leite bovino, quando comparado ao método *in vitro* aqui estudado. Em ratos obteve-se $42 \pm 5,9\%$ para leite bovino não processado (puro) e $50,9 \pm 11,1\%$ para leite bovino processado (JOHNSON e EVANS, 1978).

Em geral, comparando os resultados obtidos neste trabalho com os resultados de trabalhos citados utilizando métodos *in vitro*, pode-se confirmar grande concordância, principalmente quanto aos leites de bovinos e ovinos, indicando uma adequação do procedimento empregado.

Nos estudos dos valores em porcentagem de Ca dialisado nas diferentes amostras de leite, a Figura 6.4.2 mostra os resultados obtidos.

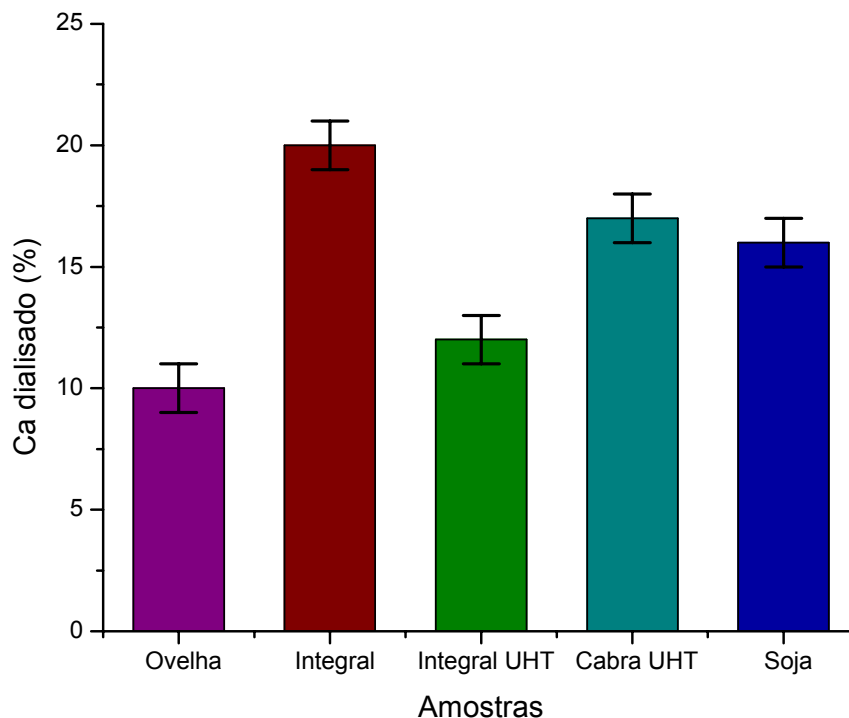


FIGURA 6.4.2 – Resultados do Ca dialisado pelo método de digestão gastrointestinal *in vitro* nas amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral UHT cabra UHT, e “leite” de soja.

De acordo com os resultados para leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral UHT, de cabra integral UHT e de soja, as porcentagens de cálcio dialisado foram em torno de $10 \pm 1\%$, $20 \pm 1\%$, $12 \pm 1\%$, $17 \pm 1\%$ e $16 \pm 1\%$, respectivamente. Os valores das porcentagens do Ca dialisado obtidos nesse estudo para os leites bovinos foram similares aos observados por PERALES et al., (2006) para amostras de leite bovino que estudou o cálcio solúvel e dialisável, bem como o transporte e a absorção (retenção + transporte) por células Caco-2 como indicadores da biodisponibilidade de cálcio nos leites não fortificados e em leites fortificados. Valores em torno de 27 a 29% foram estimados na digestão gastrointestinal *in vitro* para o Ca dialisado para as amostras não fortificadas.

Um estudo (ROIG et al., 1999a) com amostras de leite bovino, soja, leite humano e fórmulas infantis utilizando diálise *in vitro* mostrou que o leite bovino foi dialisado em $20,0 \pm 0,9\%$ e no “leite” de soja em tres diferentes fabricantes $18,0 \pm 0,7\%$, $12,7 \pm 1,6\%$, $17,6 \pm 0,9\%$, respectivamente. Pode-se observar, então, grande proximidade com os resultados obtidos nesta pesquisa para esses dois tipos de leite mencionados. Os mesmos autores (ROIG et al., 1999b), também diálise *in vitro* observaram $20,2 \pm 1,4\%$ e $13,0 \pm 1,3\%$ respectivamente em amostras de leite bovino e fórmula a base de soja, concordando com os aqui observados para leite bovino e indicando sutis diferenças em relação ao leite de soja.

Da mesma forma, autores mostraram que a biodisponibilidade de cálcio no leite de cabra é semelhante ao obtido com vacas leiteiras (SHEN et al., 1995). Além disso, a disponibilidade de cálcio dos diferentes tipos de leite (humano, bovino, cabra e ovelha), avaliada por método *in vitro* através de diálise, não diferiram significativamente, variando entre 18 e 23%.

Pesquisa feita quanto a presença de minerais nas frações solúveis após centrifugação, nos quais os elementos podem ser bem absorvidos, mostraram que 32,8 % de cálcio estava nesta fração para leite de cabra e para o leite de ovelha 20,8 % (DE LA FUENTE et al., 1997), valores maiores em relação ao encontrado neste trabalho, conforme o esperado, devido a diferenças nas condições experimentais.

O cálcio coloidal presente no leite pode ser definido como uma mistura de caseinato de cálcio (contendo fosfato orgânico) e fosfato de cálcio (que é um fosfato inorgânico). Existem quantidades significativas de cálcio-fosfato e cálcio-

citrato nas micelas de caseína. Este fosfato de cálcio micelar, que é principalmente associada à α_1 -, α_2 - e β -caseínas, é responsável pela estabilidade e estrutura das micelas de caseína (GAUCHERON, 2005).

Uma possível influência da composição da fração protéica de fórmulas infantis e leite em biodisponibilidade de cálcio tem sido relatada por vários autores (JOVANÍ et al., 2001; ROIG et al., 1999a; PERALES et al., 2006; ROIG et al., 1999b). O efeito favorável da caseína sobre a absorção de cálcio tem sido atribuído à inibição de precipitação do cálcio por fosfato no lúmen intestinal pela ação de fosfopeptídeos provenientes da hidrólise enzimática da caseína, que mantém o cálcio em uma forma solúvel e absorvível (MILLER et al., 1981). O cálcio dialisável é maior nas fórmulas em que caseína é a principal fração protéica e no hidrolisado de proteínas do que nas outras fórmulas (ROIG et al., 1999a).

O mesmo ocorreu em estudos *in vivo* em macacos e ratos, com alta biodisponibilidade de cálcio em fórmulas infantis que tinham a caseína como principal fonte protéica. Além disso, um aumento na proteína e no conteúdo de cálcio aumentou a biodisponibilidade de cálcio. No caso dos hidrolisados e fórmulas infantis a base de soja houve menor biodisponibilidade de cálcio do que as fórmulas infantis a base de leite, diferença descrita pelo tipo de peptídeo liberado durante a digestão da proteína e pelo fitato (JOVANÍ et al., 2001; ROIG et al., 1999a).

Dessa forma, em relação aos resultados obtidos para o cálcio dialisado, utilizando método *in vitro*, neste trabalho pode-se observar grande similaridade em relação aos obtidos na literatura que utilizaram esta mesma metodologia, principalmente para as amostras de leite bovino integral *in natura*, leite de cabra integral UHT e “leite” de soja.

Na Figura 6.4.3, são apresentados os resultados observados em relação ao fósforo dialisado, que resultaram em valores equivalentes a $10 \pm 1\%$, $30 \pm 1\%$, $32 \pm 1\%$, $36 \pm 3\%$ e $20 \pm 1\%$ respectivamente para amostras de leite de ovelha *in natura*, leite bovino integral *in natura*, leite bovino integral UHT, leite de cabra integral UHT e “leite” de soja.

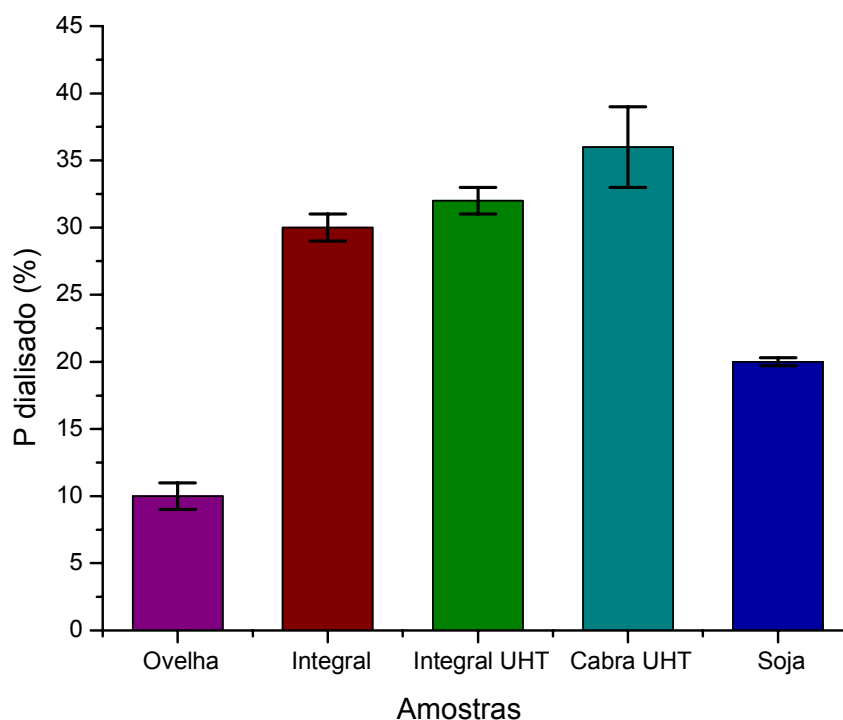


FIGURA 6.4.3 – Resultados do P dialisado pelo método de digestão gastrointestinal *in vitro* nas amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral UHT, cabra integral UHT e “leite” de soja.

Pode-se observar que foi obtido fósforo dialisado em porcentagens pouco maiores em relação ao cálcio absorvido, com exceção ao leite de ovelha, que apresentou resultado similar. Em geral, esse comportamento pode ser explicado, pois o fósforo está intimamente associado ao cálcio na nutrição humana, sendo que a proporção Ca/P deve se apresentar em torno de 1:1, para manter o equilíbrio normal sérico (COZZOLINO, 2005).

Os resultados para leite bovino integral, bovino integral UHT e de cabra integral UHT também foram próximos, apresentando destaque para leite de cabra. Estudo sobre a presença de minerais nas frações solúveis, em que os elementos podem ser bem absorvidos, mostraram que para leite de cabra, 38,6% de fósforo estava nesta fração, similar ao aqui observado. No entanto, para o leite de ovelha, os resultados se mostraram diferentes (DE LA FUENTE et al., 1997).

Nos alimentos de origem animal, o fósforo é encontrado principalmente como composto orgânico e quando hidrolisado no trato gastrointestinal, libera fósforo inorgânico, que fica disponível para absorção (SHAPIRO e HEANEYB, 2003).

Indivíduos que consomem altas quantidades de produtos derivados do leite terão ingestão mais elevada de fósforo, uma vez que a densidade do fósforo no leite bovino é superior ao observado em grande parte dos alimentos em uma dieta normal (COZZOLINO, 2005).

A caseína é a principal proteína do leite. Seus resíduos de serina são fosforilados, esses grupos fosfatos ligam-se aos íons cálcio que ajudam a manter a estabilidade do complexo. Cerca de 30% do fosfato no leite bovino ocorre na forma livre, como fosfato inorgânico.

Essas informações da literatura ajudam a confirmar os resultados obtidos com os estudos *in vitro* para o leite bovino, isto é, $30 \pm 1\%$ e $32 \pm 1\%$ para leite bovino *in natura* e UHT, respectivamente. E também concluir que possivelmente esta absorção ocorra como fosforo inorgânico.

Em bebês, tanto a quantidade de fósforo ingerido quanto a biodisponibilidade variam de acordo com a alimentação fornecida a eles. A eficiência de absorção é maior em leite materno com 85 a 90%, seguido do leite de vaca (72%) e menor em extrato de soja que contem ácido fítico (59%) (COZZOLINO, 2005). Comparando com os resultados obtidos *in vitro* em relação ao leite de soja, apesar de não ser possível fazer uma comparação com os valores obtidos nesse estudo em bebês, é possível concluir que também houve uma menor absorção do fósforo (20%) para a soja em relação às outras amostras.

Assim, estudos do elemento dialisável, por sua vez, para determinar as tendências do bioacessibilidade ou biodisponibilidade relativa para valores de zinco, cálcio e fósforo a partir de diferentes tipos de leites foram de grande valor. Embora ensaios com animais sejam menos complexos, há limitações pelas diferenças no metabolismo entre animais e seres humanos. Os procedimentos *in vitro* possibilitam uma estimativa preliminar da biodisponibilidade dos nutrientes minerais, por exemplo, em diversos alimentos, solo, espécies, cultivos, processamentos, armazenamentos e cozimentos, entre outros.

6.5 – Determinação das proteínas totais nas diferentes amostras de leite

A determinação da concentração total de proteínas foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Várias vantagens caracterizam o método

de Bradford, dentre eles, a boa sensibilidade por proteínas, determinação apenas do nitrogênio protéico, simples execução e menor tempo (5 min) de reação química (KAMIZAKE et al., 2003).

Esse procedimento baseia-se na interação entre o corante “Coomassie Brilliant Blue” BG-250 com as proteínas, ou seja, as macromoléculas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas (histidina e lisina) ou aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina). No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molar e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, formando uma solução de coloração azul que corresponde a espécie que absorverá no comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD, 1976; ZAIA et al., 1998).

As concentrações de proteínas encontradas foram concordantes com as encontradas na literatura para os dois tipos de leite bovino integral. A proteína total contida no leite bovino apresenta uma faixa de concentração podendo variar de 23 a 44 g kg⁻¹ (SILVA, 1997). Um estudo comparativo de vários métodos de determinação das proteínas totais do leite com extração dos lipídeos e sem extração, concluíram que para o método de Bradford não havia necessidade da extração dos lipídeos para determinação das proteínas totais do leite. Dessa forma, a determinação em estudo foi feita com o leite todo, utilizando apenas a diluição necessária (KAMIZAKE et al., 2003).

Para a obtenção da curva de calibração foi utilizada uma solução estoque de BSA e o coeficiente de correlação (R) da equação da reta foi 0,9969.

Uma das finalidades foi observar se o processo de pasteurização (UHT) teria ocasionado mudanças na concentração total de proteínas, quando comparado com as amostras de leite bovino integral. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.5.1.

Tabela 6.5.1 – Concentração total de proteínas nas amostras de leite de ovelha *in natura*, bovino integral *in natura*, bovino integral pasteurizado (UHT), cabra pasteurizado (UHT) e “leite “de soja.

Amostras de leite	Concentração total de proteínas (g L⁻¹)
Ovelha <i>in natura</i>	34 ± 1
Bovino integral <i>in natura</i>	21 ± 1
Bovino integral pasteurizado (UHT)	23 ± 1
Cabra pasteurizado (UHT)	18 ± 1
Soja	16 ± 1

A pasteurização é feita por aquecimento do leite à temperatura de 72 a 75 °C durante 15 a 40 segundos, seguido do resfriamento a 5 °C. Esse tratamento visa diminuir ao máximo o número de microorganismo nocivos à saúde, aumentando assim sua durabilidade, inativa algumas enzimas, mas não altera as propriedades do leite. A pasteurização do leite pelo sistema UHT (Ultra High Temperature) consiste no aquecimento do leite à temperatura de 150 °C durante 2,5 segundos e posterior resfriamento a 28 °C. Esse processo esteriliza o leite e torna-o isento de microorganismos, além de minimizar as mudanças químicas. O leite UHT armazenado de forma adequada tem uma longa vida de prateleira, mesmo a temperatura ambiente (ALEIXO, 2000; GONZÁLEZ, 2001).

O processo de pasteurização do leite bovino não afetou a concentração total das proteínas e pelos resultados das concentrações dos nutrientes analisados também não houve grande alteração nas concentrações totais, conforme afirma GÓES et al. (2002) que comparou o leite materno processado e não processado e reportou que os nutrientes como a gordura, lactose, proteína, zinco (total e em frações) e vitamina A não mostraram diferenças nos dois tipos de amostras.

A soja é um alimento fornecedor de proteínas, ácidos graxos saturados e insaturados, vitaminas, e compostos polifenólicos, como as isoflavonas (ÁVILA et al., 2007). Diferentes propostas foram feitas. Por exemplo, em programas de alimentação escolar foi comprovado que a soja pode substituir a proteína animal até o nível de 30% (PENHA, 2007) e pode ser preparada para que tenha o mesmo teor de proteínas que o leite bovino (MOMCILOVIC et al., 1976), o que pode ser confirmado com os resultados apresentados na Tabela 6.5.1. Entretanto, o valor

biológico das proteínas de soja é inferior ao das proteínas contidas no leite bovino ou às proteínas do ovo, reconhecidas como as de maior valor biológico (BEHRENS e SILVA, 2004).

As proteínas encontradas no leite de cabra apresentaram valores próximos em comparação às presentes no leite bovino. Em algumas dietas, principalmente às relacionadas à deficiência de digestão ou alergias, o leite de cabra é o mais indicado, pois pode ser digerido em 40 minutos no estômago humano enquanto que o leite bovino levará duas horas e meia. Além disso, o leite de cabra tem melhor capacidade de proteção devido à caseína e fosfatos, sendo bom para o tratamento de úlceras (BEDA, 2002). Existe uma maior concentração de proteína total do leite de ovelha em relação aos outros tipos de leite, conforme descrito no estudo por RAYNAL-LJUTOVACA et al. (2008) e nos resultados obtidos neste trabalho. No entanto, a razão de caseína na proteína total também pode variar entre espécies e de acordo com o animal (RAYNAL-LJUTOVACA et al., 2008).

6.6 – Determinação de zinco, cálcio e fósforo nas rações dadas como alimento da raça Santa Inês

Na Tabela 6.6.1 encontram os resultados da determinação de zinco, cálcio e fósforo nas amostras de ração dada as ovelhas e na Tabela 6.6.2 são apresentados os resultados obtidos para zinco, cálcio e fósforo no leite de ovelha *in natura*.

Tabela 6.6.1 – Concentração total de zinco, cálcio e fósforo em amostras de ração utilizadas para a nutrição ovelha da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste.

Elementos	Amostra de ração animal
Zn (mg kg ⁻¹)	179 ± 4
Ca (g kg ⁻¹)	10 ± 1
P (g kg ⁻¹)	7 ± 1

Tabela 6.6.2 – Concentração total de zinco, cálcio e fósforo em amostras de leite de ovelha *in natura* da raça Santa Inês criadas na Embrapa Pecuária Sudeste

Elementos	Amostra de leite de ovelha <i>in natura</i>
Zn (mg L ⁻¹)	2,76 ± 0,01
Ca (mg L ⁻¹)	1671 ± 5
P (mg L ⁻¹)	1575 ± 44

É possível observar na Tabela 6.6.1 que a quantidade de zinco introduzida na alimentação das ovelhas ultrapassou as exigências de minerais para ovinos, porém isto não influenciou a concentração deste elemento no leite, que apresentaram os níveis esperados. Provavelmente este excesso de zinco tenha sido eliminado através da urina e fezes. Altas concentrações de cálcio e fósforo na ração podem ter resultado altas concentrações desses elementos no leite de ovelha, maiores que as concentrações nos outros tipos de amostras de leite estudadas neste trabalho, porém esses níveis são geralmente elevados. Deve-se levar em conta não apenas a quantidade de nutriente que está presente na dieta, mas principalmente a sua biodisponibilidade, para que se tenha a avaliação correta a respeito da adequação da dieta para a saúde do animal e conseqüente produção de leite de boa qualidade para o consumidor.

Capítulo 7

Conclusões

7 – Conclusões

Os teores totais de zinco, cálcio e fósforo encontrados foram comparáveis aos de outros trabalhos já estudados. A técnica ICP OES apresentou limites de detecção e quantificação adequados em função dos teores presentes nas amostras. A exatidão do método de decomposição e análise foi comprovada por determinação dos teores em material certificado, apresentando nível de 95% de confiança

Os estudos relacionados à separação e determinação de espécies químicas em proteínas de diferentes tipos de leite demonstraram que o emprego da técnica UREA-PAGE foi eficiente para a separação e estimativa das faixas de massas molares das proteínas em amostras. Dessa forma, podem ser considerados representativos das β -caseínas (bandas de 32 kDa) e α -caseínas (bandas de 24 kDa). Para o “leite” de soja, pode-se concluir que a proteína de 52 kDa pode ser uma subunidade de β -conglucina e a banda protéica de 39 kDa condiz com ácidos polipeptídicos de glicina.

Com relação ao leite bovino integral *in natura* e ao leite bovino integral pasteurizado (UHT), verificou-se similaridade entre as bandas de caseínas presentes nas duas amostras, não indicando modificação dessas proteínas em função do processo de pasteurização do leite.

Os resultados obtidos na distribuição do zinco em bandas protéicas foram semi-quantitativos, sendo possível obter informações das concentrações aproximadas de Zn entre as bandas protéicas das diferentes amostras de leite.

A estimativa de Zn presente nas proteínas de 32 kDa indicou 15% para leite bovino integral pasteurizado (UHT), 9% para o leite bovino integral *in natura* (9%), 3% para leite de cabra integral (UHT) e 1,4% em leite de ovelha *in natura*.

Para Zn nas bandas protéicas de 24 kDa – 9% no leite de ovelha *in natura* e 5% para leite bovino integral pasteurizado (UHT).

No leite de soja foi possível estimar 3% de Zn somente na banda protéica de 39 kDa.

Não houve grandes diferenças entre a estimativa da ligação de Zn-proteínas, considerando o processo de pasteurização e o leite bovino integral *in natura*, que apresentaram as maiores concentrações de zinco na banda de 32 kDa

para as duas amostras de leite, com maior tendência para o leite pasteurizado (UHT).

Nos estudos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*:

Para Zn, “leite” de soja > bovino integral *in natura* = bovino integral UHT > ovelha *in natura* > cabra integral UHT;

Para Ca, bovino integral *in natura* > cabra integral UHT > “leite” de soja > bovino integral UHT > ovelha *in natura*;

E para P, cabra integral UHT > bovino integral UHT > bovino integral *in natura* > “leite” de soja > ovelha *in natura*;

O leite bovino integral pasteurizado (UHT) apresentou concentração total das proteínas próxima ao valor encontrado para o leite bovino integral *in natura*.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8 – Referências Bibliográficas

ALEIXO, P. C. *Determinação Direta de Fe e Se em Leite por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2000. Dissertação de mestrado, 123 p.

ABTAHI, S. & AMINLARI, M. "Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of soybean milk base". *J. Agric. Food Chem*, **45**: 4768, 1997.

AL-AWADI, F. M. & SRIKUMAR, T. S. "Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks". *J. Dairy Res.*, **68**: 463, 2001.

ANDREWS, A. T. "Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins". *J. Dairy Res.*, **50**: 45, 1983.

ARAÚJO, G. C. L. *Preparo de Amostras e Determinação dos Constituintes Inorgânicos por ICP OES para Caracterização Química do Gênero Paspalum (Poaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de doutorado, 172 p.

ÁVILA, M. R., BRACCINI, A. L., SCAPIM, C. A.; MANDARINO, J. M. G., ALBRECHT, L. P & VIDIGAL FILHO, P. S. "Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja". *Rev. bras. sementes*, **29** (3): 111, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R.E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2001.

BEDA, F. F. *Hipersensibilidade ao Leite de Vaca e Possível Terapia Utilizando o Leite de Cabra*. São Paulo, 2002. 72 p. Monografia apresentada para a conclusão do curso de Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Paulista.

BEHRENS, J. H. & SILVA, M. A. A. P. "Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados" *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **24**(3): 431, 2004.

BERMEJO, P., PENA, E., FOMPEDRINA, D., DOMINGUEZ, R., BERMEJO, A., FRAGA, J. M. & COCHO, J. A. "Copper fractionation by SEC-HPLC and ETAAS: study of breast milk and infant formulae whey used in lactation of full-term newborn infants" *Analyst*, **126**: 571, 2001.

BINET, M. R. B., MA, R., MCLEOD, C. W. & POOLE, R. K. "Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry" *Anal. Biochem.*, **318**: 30, 2003.

BLAKEBOROUGH, P., SALER, D.N. & GURR, M.I. "Zinc binding in cow's milk and human milk". *Biochem. J.*, **209**: 505, 1983.

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248, 1976.

BRÄTTER, P., BLASCO, I. N., BRÄTTER, V. E. N. & RAAB, A. "Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition". *Analyst*, **123**: 821, 1998.

BRITO, M. A., GONZÁLEZ, F. D., RIBEIRO, L. A., CAMPOS, R., LACERDA, L., BARBOSA, P. R. & BERGMANN, G. "Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação" *Ciência Rural, Santa Maria*, **36**(3): 942, 2006.

BULDINI, P.L., CAVALLI, S. & SHARMA, J.L. "Matriz removal for the ion chromatographic determination of some trace elements in milk". *Microchem. J.*, **72**: 277, 2002.

BURGUERA, J.L., BURGUERA, M., CARRERO, P., RIVAS, C., GALLIGNANI, M. & BRUNETTO, M.R. "Determination of iron and zinc in adipose tissue by on-line microwave-assisted mineralization and flow-injection graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, **308**: 349, 1995.

CÁMARA, F., AMARO, M.A., BARBERA, R. & CLEMENTE, G. "Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods". *Food Chemistry*, **92**: 481, 2005.

CAMPOS, R.C. & GRINBERG, P. "Acoplamento cromatografia gasosa – espectrometria de absorção atômica em estudos de especiação: uma revisão". *Quim. Nova*, **24** (2): 220, 2001.

CARUSO, J. A. & BAYON M. M. "Elemental speciation studies—new directions for trace metal analysis". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**: 148, 2003.

CARUSO, J. A., KLAUE, B., MICHALKE, B., & ROCKE, D. M. "Group assessment: elemental speciation". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**: 32, 2003.

CAVA-MONTESINOS, P., CERVESA, M. L., PASTOR, A. & DE LA GUARDIA, M. "Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk". *Anal. Chim. Acta*, **531**: 111, 2005.

CAVA-MONTESINOS, P., DE LA GUARDIA, A., TEUTSCH, C., CERVESA, L. & DE LA GUARDIA M. "Speciation of selenium and tellurium in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 696, 2004.

CERKLEWSKI, F. L. "Calcium fortification of food can add unneeded dietary phosphorus". *J. Food Comp. Anal.*, **18**: 595, 2005.

CHIOU, S. H. & WU, S. H. "Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology", *Anal. Chim. Acta*, **383**, 47-60, 1999.

CHÉRY, C. C., MOENS L., CORNELIS R. & VANHAECKE, F. "Capabilities and limitations of gel electrophoresis for elemental speciation: A laboratory's experience". *Pure Appl. Chem.*, **78**(1): 91, 2006.

CONI, E., ALIMONTI, A., BOCCA, A., LA TORRE, F., PIZZUTI, D. & CAROLI, S. "Speciation of trace elements in milk by high-performance liquid chromatography combined with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry" Element Speciation in Bioinorganic Chemistry, edited by Sergio Caroli. *Chemical analysis Series*, **135**: 255, 1996.

CONI, E., BOCCA, B., GALOPPI, B., ALIMONTI, A. & CAROLI, S. "Identification of chemical species of some trace and minor elements in mature breast milk". *Microchem. J.*, **67**: 187, 2000.

CONRAD, J.H., MCDOWELL, L. R., ELLIS, G. L. & LIEOSLI, J. K. *Minerais para Ruminantes em Pastejo em Regiões Tropicais*. Depart. de ciência animal, Centro de Agricultura Tropical; Universidade da Florida, Gainesville e Agência Americana para o Desenvolvimento Internacional, 1985.

CORNELIS, R., CREWS, H., CARUSO J., & HEUMANN, K. G. *Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine & Occupational Health*. John Wiley & Sons, 2005, p. 488.

COSTA, E.O. "Importância da mastite na produção leiteira do país". *Revista Educação Continuada*, SP, **1**: 3, 1998.

COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de Nutrientes*, Barueri - SP. Editora Manole Ltda. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Brasil, 2005.

DE LA FUENTE, M.A., GUERRERO, G. & JUÁREZ, M. "Manganese and zinc analysis in milk by microwave oven digestion and platform graphite furnace atomic absorption spectrometry". *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 2406, 1995.

DE LA FUENTE, M. A., OLANO, A. & JUÁREZ, M. "Distribution of calcium, magnesium, phosphorus, zinc, manganese, copper and iron between the soluble and colloidal phases of ewe's and goat's milk". *Lait* **77**: 515, 1997.

DE LA GUARDIA, M.; CERVERA, M.L. & MORALES-RUBIO, A. *Speciation Studies by atomic spectroscopy*". In: *Advances in Atomic Spectroscopy*. **5**: 1-98, 1999. Jay Press Inc., New York, USA.

EGITO, A. S., ROSINHA, G. M. S., LAGUNA, L. E., MICLO, L., GIRARDER, J. M. & GAILLARD, J. L. "Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino" *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **58**(5): 932, 2006.

EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE – Ovinocultura: controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste, 2007 - Documento 65

<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/documentos/Documentos65.pdf> - acessado em 10/01/2009.

FAIRWEATHER-TAIT, S. & HURRELL, R. F. "Bioavailability of minerals and trace elements". *Nutr. Res. Rev.*, **9**: 295, 1996.

FARRELL, H. M., JIMENEZ-FLORES, JR.R., BLECK, G. T., BROWN, E. M., BUTLER J. E., CREAMER, L. K., HICKS, C. L., HOLLAR C. M., NG-KWAI-HANG, K. F. & SWAISGOOD, H. E. "Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth Revision". *J. Dairy Sci.*, **87**:1641, 2004.

GARCIA, J. S., MAGALHÃES, C. S. & ARRUDA, M. A. Z. "Trends in metal-binding and metalloprotein analysis". *Talanta*, **69**: 1, 2006.

GAUCHERON, F. "The minerals of milk". *Reprod. Nutr. Dev.* **45**: 473, 2005.

GAUCHERON, F., LE GRAET, Y., BOYAVAL, E. & PIOT, M. "Binding of cations to sodium caseinate: importance of physicochemical conditions". *Milchwissenschaft* **52**(6): 322, 1997.

GÓES, H. C.A., TORRESE, A.T., DONANGELO, C. M. & TRUGO, N.M.F. "Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions" *Nutrition*, **18**: 590, 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D. *Composição Bioquímica do Leite e Hormônios da Lactação In: Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras.* González, F. H. D., Dürr, J. W. & Fontaneli, R. S. (Editores). Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2001.

GONZALEZ, F.H.D., OPINA H. & BARCELLOS J.O.J. *Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos criados em regime de campo.* Artigo revisado e ampliado da publicação Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V., Ed. Nutrição Mineral em Ruminantes, 2ª ed. UFRGS, Porto Alegre, RS, 1998, p. 11-22.

GÜLER Z. "Levels of 24 minerals in local goat milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yogurt)". *Small Ruminant Research* **71**: 130, 2007.

GUTIÉRREZ, R. B. *Elaboración Artesanal de Quesos de Oveja.* Montevideo-Uruguay: Comunidad del Sur, 1991, 174p.

HARZER G. & KAUER, H.B. S "Binding of zinc to casein". *Am J Clin Nutr.* **35**: 981, 1982.

HASLER, C.M. "Functional foods: their role in disease prevention and health promotion". *Food Tech.*, **52**(11): 63, 1998.

HUANG, S. D. & SHIH, K. Y. "Direct determination of zinc in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry" *Spectrochim. Acta*, **50b**: 837, 1995.

HÜBNER, C. H., PIRES, C. C., GALVANI, D. B., CARVALHO, S. & WOMMER, T. P. "Consumo de nutrientes, produção e composição do leite de ovelhas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro". *R. Bras. Zootec.*, **36**(6): 1882, 2007.

JENSEN, R. G. *Handbook of Milk Composition*. Food Science and Technology International Series, 1995, 919 p.

JOHNSON, P. E. & EVANS, G. W. "Relative zinc availability in human breast milk, infant formulas, and cow's milk". *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**: 416, 1978.

JOVANÍ, M., BARBERÁ, R. & FARRÉ, R. "Review: effect of some components of milk- and soy-based infant formulas on mineral bioavailability". *Food Sci. Tech. Int.*, **7**(3): 191, 2001.

JUNG, S., MURPHY, P. A. & SALA I. "Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans". *Food Chem.*, **111**: 592, 2008.

KAMIZAKE, N. K. K., GONÇALVES, M. M. & ZAIA, D. A. M. "Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the kjeldahl method and spectrophotometric methods". *J. Food Comp. Anal.*, **16**: 507, 2003.

KRUG, F. J. *Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar*. 1 ed., editado por Francisco José Krug, Piracicaba, 2008.

KRUSHEVSKA, A., BARNES, R. M., AMARESIRIWARADENA, C. J., FORNER, H. & MARTINES, L. "Comparison of sample decomposition procedures for the determination of zinc in milk by inductively coupled plasma emission spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**: 851, 1992.

LEE J. D., Trad. TOMA, H. E.; ARAKI, K.; ROCHA, R. C. *Química Inorgânica Não Tão Concisa*. 2ª ed. São Paulo, Edgard Blucher – Editora, 2001, p. 425.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica – Componentes Moleculares das Células – volume 1*, 2ª edição, editora Edgard Blücher Ltda, 1976.

LEITE, Z. T. C., VAITSMAN, D. S. & DUTRA, P. B. "Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade". *Quim. Nova*, **29**(4): 876, 2006.

LONNERDAL, B. "Dietary factors influencing zinc absorption". Presented at the international workshop "Zinc and Health: Current Status and Future Directions" held at the National Institutes of Health in Bethesda, MD, 1998.

LONNERDAL, B., CEDERBLAD, A., DAVIDSSON, L., & SANDSTROM B. "The effect of individual components of soy formula and cows' milk formula on zinc bioavailability". *Am. J. Clin. Nutr.*, **40**: 1064, 1984.

LÖNNERDAL, B., YUEN, M., GLAZIER, C. & LITOV, R., "Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups". *Am. J. Clin. Nutr.*, **58**: 392, 1993.

MA, C. Y., LIU, W. S., KWOKB, K. C. & KWOKB, F. "Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara)". *Food Res. Int.*, **29** (8): 199, 1997.

MA, R., MCLEOD, C. W., TOMLINSON, K. & POOLE, R. K., "Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry", *Electrophoresis*, **25**(15): 2469, 2004.

MACEDO Jr., G. L. *Influência de Diferentes Níveis de FDN Dietético no Consumo, Digestibilidade Aparente e no Comportamento Ingestivo de Ovelhas Santa Inês*. Dissertação (mestrado). Zootécnica. Área de concentração: Nutrição de Ruminantes. Universidade Federal de Lavras –MG, 2004, 127p.

MAFRA, D. & COZZOLINO, S. M. F. "Importância do zinco na nutrição humana". *Rev. Nutr.* **17**(1): 79, 2004.

MAGALHÃES, C. S. & ARRUDA, M. A. Z. "Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts". *Talanta*, **71**: 1958, 2007.

MARTINO, F. A. R., SÁNCHEZ, M.L.F. & SANZ MEDEL, A. "Multi-elemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS". *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**:1271, 2002.

MAYER, H. K. "Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques". *Int. Dairy J.*, **15**: 595, 2005.

MICHALKE, B. "Element especiation definitions, analytical methodology, and some examples". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**: 122, 2003.

MICHALKE, B., & SCHRAMEL, P., "Manganese speciation in human milk using size exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection" *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**: 121, 2004.

MILLER, D. D., SCHRICKER, B. R. & RASMUSSEN VAN CAMPEN, D. "An in vitro method for estimation of iron availability from meals" *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**: 2248, 1981.

MIQUEL, E. & FARRÉ, R., "Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability". *Trends Food Sci. Tech.*, **18**: 139, 2007.

MIQUEL, E., ALEGRÍA, A., BARBERÁ, R. & FARRÉ, R. "Speciation analysis of calcium, iron and zinc in casein phosphopeptide fractions from toddler milk – based formula by anion exchange and reverse-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry / flame atomic-absorption spectroscopy". *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**: 1082, 2005.

MOMCILOVIC, B., BELONJE, B., GIROUX, A. & SHAH, B. G. "Bioavailability of zinc in milk and soy protein-based infant formulas" *J. Nutr.* **106**: 913, 1978.

MUNIZ-NAVEIRO, O., DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R., BERMEJO-BARRERA, A., BERMEJO-BARRERA P., COCHO, J. A. & FRAGA, J. M. "Study of the bioavailability of selenium in cow's Milk after a supplementation of cow feed with different forms of selenium" *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**: 189, 2006.

MUNIZ-NAVEIRO, O., DOMINGUEZ-GONZALEZ, R., BERMEJO-BARRERA, A., COCHO, J. A., FRAGA, J. M. & BERMEJO-BARRERA, P. "Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS" *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**: 1145, 2005.

NASCENTES, C. C., ARRUDA, M. A. Z., NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry" *Talanta*, **64**: 912, 2004.

NICKEL, K. P., MARTIN, B. R., SMITH, D. L., SMITH, J. B., MILLER, G. D. & WEAVER, C. M. "Calcium bioavailability from bovine milk and dairy products in premenopausal women using intrinsic and extrinsic labeling techniques" *J. Nutr.*, **126**: 1406, 1996.

PABÓN, M. L. & LÖNNERDAL, B. "Bioavailability of zinc and its binding to casein in milks and formulas" *J. Trace Elements Med. Biol.*, **14**: 146, 2000.

PEDROSA, L. F. C. & COZZOLINO, S. M. F. "Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil" *Rev. Saúde Pública*, **27**(4): 266, 1993.

PENHA, L. A. O., FONSECA, I. C. B., MANDARINO, J. M. & BENASSI, V. T. "A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico" *B.CEPPA, Curitiba*, **25** (1): 91, 2007.

PERALES, S., BARBERÁ, R., LAGARDA, J. & FARRÉ, R. "Fortification of milk with calcium: effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc" *J. Agric. Food Chem.* **54**: 4901, 2006.

PEREIRA, D. B. C. *Utilização de Técnicas de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Identificação da Adição de Leite de Vaca ao Leite de Cabra.* – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2003. Dissertação de mestrado, 124p.

POHL, P. & PRUSISZ, B., "Determination of Ca, Mg, Fe and Zn partitioning in UHT cow milks by two-column ion exchange and flame atomic absorption spectrometry detection" *Talanta*, **71**: 715, 2007.

RAYNAL-LJUTOVACA, K., LAGRIFFOULB, G., PACCARDB P., GUILLET, I. & CHILLIARDC, A., Y. "Composition of goat and sheep milk products: An update" *Small Ruminant Research*, **79**: 57, 2008.

REN, C., TANG, L., ZHANG, M. & GUO, S. "Interactions between whey soybean protein (WSP) and beta-conglycinin (7S) during the formation of protein particles at elevated temperatures" *Food Hydrocolloids*, **23**: 936, 2009.

RIBEIRO E. L. DE A. & RIBEIRO, H. J. S. de S. "Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra" *Semina: Ci. Agrárias*, Londrina, **22** (2): 229, 2001.

ROIG, M.J., ALEGRÍA, A., BARBERÁ, R., FARRÉ, R. & LAGARDA, M.J. "Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas" *Food Chem.*, **64**: 403, 1999a.

ROIG, M. J., ALEGRÍA, R., BARBERÁ, R., FARRÉ, R. & LAGARDA, M. J. "Calcium bioavailability in human Milk, cow Milk and infant formulas-comparison between dialysis and solubility methods" *Food Chem.*, **65**: 353, 1999b.

RUZ M., CODOCEO, J., INOSTROZA, J., REBOLLEDO, A., KREBS, N. F., WESTCOTT, J. E., SIAN, L. & HAMBIDGE, K. M. "Zinc absorption from a micronutrient-fortified dried cow's milk used in the Chilean National Complementary Food Program". *Nutr. Res.*, **25**: 1043, 2005.

SAKAI, K., TACHIKI, T., KUMAGAI, H. & TOCHIKURA, T. "Hydrolysis of a-D-Galactosyl oligosaccharides in soymilk by a-D-Galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203". *Agric. Biol Chem.*, **51**(2): 315, 1987.

SANDSTROM, B., KEEN, C. L. & LONNERDAL, B. "An experimental model for studies of zinc bioavailability from milk and infant formulas using extrinsic labeling". *Am. J. Clin. Nutr.*, **38**: 420, 1983.

SHAPIRO, A. R. & HEANEY, R. P. "Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bone development under conditions of varying deficiency". *Bone*, **32**: 532, 2003.

SCHEPLYAGINA, L. A. "Impact of the mother's zinc deficiency on the woman's and newborn's health status". *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **19**: 29, 2005.

SENA, K. C. M. & PEDROSA, L. F. C. "Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes". *Rev. Nutr.*, **18**(2): 251, 2005.

SHEN, L., ROBBERECHT, H., VAN DAEL, P. & DEELSTRA, H. "Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's, goat, and sheep milk by an in vitro method". *Biol. Trace Elem. Res.*, **49**(2-3): 107, 1995.

SILVA, F.V., LOPES, G. S., NÓBREGA, J. A., SOUZA, G. B. & NOGUEIRA, A. R. A. " Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk" *Spectrochim. Acta Part B*, **56**: 1909, 2001.

SILVA Jr., J. G. *Eletroforese de Proteínas: Guia Teórico de Prático*, Interciência, Rio de Janeiro, 2001, 125p.

SILVA, P. H. F. da “Leite – aspectos de composição e propriedades”. *Química Nova na Escola*, **6**: 3-5, 1997.

SILOTO, R. C. *Especiação de cobre e zinco em água de coco e a influência do processo de pasteurização sobre essas espécies*. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2005. Dissertação de mestrado, 76p.

SOUZA, A. C. K. O. de; OSÓRIO, M. T. M.; OSÓRIO, J. C. da S.; OLIVEIRA, N. M. de; VAZ, C. M. S.; SOUZA, M. & CORRÊA, G. F. R. “Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale”. *Bras. Agrociência*, **11**(1): 73, 2005.

SOUZA, E. M. T. de, ARRUDA, S. F., BRANDÃO, P. O., SIQUEIRA, E. M. A. “Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages”. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **20**(3):1, 2000.

SUSSULINI, A., GARCIA, J. S., MESKO, M. F., MORAES, D. P., FLORES, E. M. M., PÉREZ, C. A. & ARRUDA, M. A. Z. “Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis”. *Microchim. Acta*, **158**: 173, 2007.

TEMPLETON, D. M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L. G., MUNTAU, H., LEEUWEN, H.P.V. & LOBINSKI, R. “Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches”. *Pure Appl. Chem.*, **72**(8): 1453, 2000.

THOMSEN, V., ROBERTS, G. & BURGESS, K. “The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry”. *Spectrosc.*, **15**: 33, 2000.

VANDECASTEELE, C & BLOCK C. C.; *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley & Sons, 1993.

VAN HEKKEN, D. L. & THOMPSON, M. P. “Application of PhastSystemB to the resolution of bovine milk proteins on Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”. *J. Dairy Sci*, **75**:1204, 1992.

VELASCO-REYNOLD, C., NAVARRO-ALARCON, M., LÓPEZ-G DE LA SERRANA, H., PEREZ-VALERO, V. & LOPEZ-MARTINEZ, M. C. “In vitro determination of zinc dialyzability from duplicate hospital meals: influence of other nutrients”. *Nutrition*, **24**: 84, 2008.

VELOSO, A. C. A, TEIXEIRA, N., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. & FERREIRA, M. A. “Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas”. *Quim. Nova*, **25** (4): 609, 2002a.

VELOSO, A. C. A., TEIXEIRA, N. & FERREIRA I. M. P. L. V. O. “Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis detection of milk adulterations”. *J. Chromatogr. A*, **967**: 209, 2002b.

VERBI, F. M., ARRUDA, S. C. C., RODRIGUEZ, A. P. M., PÉREZ, C. A. & ARRUDA, M. A. Z. "Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry". *J. Biochem. Biophys. Methods*, **62**: 97, 2005.

VIEIRA, E. C., *Avaliação de Potencialidades e Aplicações de Espectrômetros com Plasma Acoplado Indutivamente em Análises Químicas*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado. 112p.

ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V. & LICHTIG, J. "Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes". *Quím. Nova*, **21**(6): 787, 1998.

WHITTAKER, P., SPIVEY FOX, M. R. & FORBES, A. L. "In vitro prediction of iron bioavailability for food fortification". *Nutr. Rep. Int.*, **39**(6): 1205, 1989.

WEB ELEMENTS - <http://www.webelements.com/zinc>, acessado em 23/05/2008.

WEB ELEMENTS - <http://www.webelements.com/calcium> acessado em 10/01/2009.

WEB ELEMENTS - <http://www.webelements.com/phosphorus> acessado em 10/01/2009.