

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA LICENCIATURA

EDSON FERREIRA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA E
ESPECTROFOTOMETRIA DA LACTOFERRINA BUBALINA (*Bubalus
bubalis*)**

Maceió
2021

EDSON FERREIRA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA E
ESPECTROFOTOMETRIA DA LACTOFERRINA BUBALINA (*Bubalus
bubalis*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia – IQB da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, com requisito para obtenção de graduação em Química Licenciatura.

Orientador: Prof. Dra. Sonia Salgueiro Machado.

Maceió
2021

EDSON FERREIRA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA E
ESPECTROFOTOMETRIA DA LACTOFERRINA BUBALINA (*Bubalus
bubalis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia – IQB da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob orientação da Professora Dr. Sonia Salgueiro Machado, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciatura em Química.

Banca examinadora:



Sonia Salgueiro Machado
Orientador



Davida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos



Edma Carvalho de Miranda

Maceió
2021

Esse trabalho dedico a Deus e à minha família, especialmente Dorginete Ferreira e Heleno Vicente meus pais que sempre me deram suporte e apoio nos estudos.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Sena.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, a Deus por toda a proteção e bondade em me conceder a oportunidade de poder realizar os meus sonhos e conduzir os meus passos para o correto bem como, a Nossa Senhora dos Prazeres que sempre pedi a interseção nos estudos.

A professora Dra. Sonia Salgueiro Machado, pela oportunidade de realizar este trabalho acreditando em minha capacidade norteando em toda a pesquisa e sempre presente me ensinou a pensar como um cientista e ser um cientista.

Ao grupo lactoferrina orientado pela professora Dra. Fabiane Caxico e professora Dra. Sonia Salgueiro e a parceira de atividades Me. Milena.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas – (UFAL).

A todos os professores do IQB que contribuíram diretamente ou indiretamente para a construção do meu conhecimento desde as graduações até hoje.

Aos professores doutores que se disponibilizaram para compor a banca examinadora: Dra. Edma Carvalho de Miranda, Me. Davida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE) que contribuíram fortemente para a realização deste projeto e na minha auto estima em todos dias de trabalho: Dra. Claudiane Marinho, M.e Milena, Álvaro, Wanderson, Allana Moura, Mark, Abner, Andressa, Mauricio, Marta e Marcos; e aos professores Dr. Vitor Lima e Dr. José Maria.

Aos colegas de laboratórios de Metabolismo e Proteoma (LAMP) pelo companheirismo, boa vontade e disponibilidade: Cledson e Dávida.

Aos funcionários Aldyr e Dona Geruza.

Aos meus pais, Heleno Vicente e Dorginete Ferreira, meus irmãos Claudio, Cladevan, De assis, Alexandra, Maria José e Claudelice por me apoiaram e incentivaram todos esses anos.

A minha namorada, Claudiane Maria que sempre me apoiou nos meus estudos durante os 8 anos de namoro.

RESUMO

As proteínas do soro possuem alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais. Dentre as proteínas do soro, a lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína com massa molecular aproximadamente de 80 kDa, presente no soro de leite de mamíferos, pertencente à família das transferrina, pode ser encontrada no leite de vários mamíferos. Além de ter uma habilidade específica de realizar ligação com o íon ferro, a Lf é uma proteína multifuncional possuindo as funções, tais como a atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Assim, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar lactoferrina de leite bubalino, monitorando a purificação por técnicas de fluorimetria e espectrofotometria UV-vis. O processamento do leite de búfala iniciou-se com a separação da gordura por centrifugação. O leite desnatado foi acidificado com HCl 0,1 M até o pH 4,6 obtendo o soro acidificado. Em seguida, o soro ácido foi neutralizado com NaOH 0,1 M até o pH 6,8 e o sobrenadante obtido por centrifugação foi submetido a precipitação salina nos perfis de 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% de saturação de sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As análises fluorimétricas das frações salinas foram realizadas em condições de comprimento de excitação a 290 nm e comprimentos de onda de emissão entre 300-550 nm. O perfil salino do precipitado ressuspensionado 40-60% apresentou o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina (pico em 332 nm). O precipitado ressuspensionado 40-60% foi submetido a cromatografia líquida em coluna de gel filtração Sephacryl S-100. Os estudos espectrofotométricos foram realizados com adições de 100 μL de fração salina 40-60% (0,421 mg/mL), 100 μL de lactoferrina purificada (0,421 mg/mL) e 100 μL de amoxicilina ($2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹). Os espectros UV-vis de absorção foram registrados de 190 à 450 nm. As frações 12 a 16 apresentaram o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina. A eletroforese SDS-PAGE à 8%, empregando lactoferrina comercial (SIGMA) como padrão, mostrou a presença de duas bandas proteicas na faixa do padrão. Através dos estudos espectros UV-vis de absorção foi possível detectar que a interação entre a lactoferrina e a amoxicilina desempenham um papel importante, diminuindo o espectro UV-vis de absorção quando comparado com o da lactoferrina parcialmente purificada. Portanto, foi possível isolar e purificar parcialmente lactoferrina bubalina por cromatografia líquida em coluna de gel-filtração, a lactoferrina de bubalinos possui um peso molecular maior que 87 kDa é possível realizar o monitoramento por fluorimetria e espectrometria as etapas de purificação e caracterização.

Palavras-chaves: Lactoferrina, funções biológicas, purificação, fluorimetria e espectrofotometria.

ABSTRACT

Whey proteins have a high nutritional value, given by the presence of proteins with a high content of essential amino acids. Among the whey proteins, lactoferrin (Lf) is a glycoprotein with a molecular mass of approximately 80 kDa, present in mammalian whey, belonging to the transferrin family, it can be found in the milk of several mammals. In addition to having a specific ability to bind iron ion, Lf is a multifunctional protein having functions such as antibacterial, antiviral, antifungal, antiinflammatory and immunomodulatory activities. Thus, this work aimed to purify and characterize lactoferrin from buffalo milk, monitoring the purification by fluorimetry and UV-vis spectrophotometry techniques. The processing of buffalo milk began with the separation of fat by centrifugation. The skimmed milk was acidified with 0.1 M HCl to pH 4.6 obtaining acidified whey. Then, the acid serum was neutralized with 0.1 M NaOH to pH 6.8 and the supernatant obtained by centrifugation was subjected to saline precipitation in the profiles of 0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80% saturation of ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fluorimetric analyzes of the saline fractions were carried out under conditions of excitation length at 290 nm and emission wavelengths between 300-550 nm. The saline profile of the 40-60% resuspended precipitate showed the characteristic fluorescence extinction spectrum of lactoferrin (peak at 332 nm). The 40-60% resuspended precipitate was subjected to liquid chromatography on a Sephacryl S-100 gel filtration column. The spectrophotometric studies were performed with additions of 100 μL of 40-60% saline fraction (0.421 mg/mL), 100 μL of purified lactoferrin (0.421 mg/mL) and 100 μL of amoxicillin (2.5×10^{-6} mol.L⁻¹). The UV-vis absorption spectra were recorded from 190 to 450 nm. Fractions 12 to 16 showed the characteristic fluorescence extinction spectrum of lactoferrin. 8% SDS-PAGE electrophoresis, using commercial lactoferrin (SIGMA) as a standard, showed the presence of two protein bands in the standard range. Through the UV-vis absorption spectra studies, it was possible to detect that the interaction between lactoferrin and amoxicillin play an important role, decreasing the UV-vis absorption spectrum when compared to that of partially purified lactoferrin. Therefore, it was possible to isolate and partially purify lactoferrin buffalo by liquid chromatography in a gel-filtration column, the lactoferrin from buffaloes has a molecular weight greater than 87 kDa, it is possible to monitor the purification and characterization steps by fluorimetry and spectrometry.

Key-words: Lactoferrin, biological functions, purification, fluorimetry and spectrophotometry.

LISTA DE FIGURA

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 (A). MODELO DE PREDIÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DE UMA LACTOFERRINA DO LEITE HUMANO COM LIGAÇÃO AO FERRO E COM O LOBO N À ESQUERDA E O LOBO C À DIREITA. EM CADA LÓBULO, O DOMÍNIO 1 ESTÁ EM OURO E O DOMÍNIO 2 ESTÁ EM VERDE. A A-HÉLICE QUE UNE OS DOIS LOBOS ESTÁ EM CIANO. A HÉLICE DO TERMINAL C, QUE PODE MEDIAR INTERAÇÕES COOPERATIVAS ENTRE OS LOBOS, ESTÁ EM AZUL ESCURO. OS DOIS ÍONS Fe^{3+} , LIGADOS NA FENDA INTERDOMÍNIO DE CADA LOBO, SÃO MOSTRADOS COMO ESFERAS VERMELHAS. FIGURA 1 (B): SÍTIO DE LIGAÇÃO AO FERRO DA LACTOFERRINA. SÍTIO DE LIGAÇÃO DO FERRO NO LOBO N: DUAS TIROSINAS (Y92 E Y192), UM ÁCIDO ASPÁRTICO (D60), UMA HISTIDINA (H253) E UM ÂNION CARBONATO (CO_3^{2-}) JUNTAMENTE COM O RESÍDUO DE ARGININA (R121). DOIS RESÍDUOS BÁSICOS ATRÁS DO LOCAL DO FERRO, UMA ARGININA (R210) E UMA LISINA (K301) AJUDAM A MODULAR A LIBERAÇÃO DE FERRO. | 23 |
| FIGURA 2. FLUXOGRAMA DO PROTOCOLO PROCESSAMENTO..... | 39 |
| FIGURA 3. FLUXOGRAMA DO PROTOCOLO DO FRACIONAMENTO PROTEICO POR PRECIPITAÇÃO SALINA (<i>SALTING-OUT</i>)..... | 41 |
| FIGURA 4. PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO. | 42 |
| FIGURA 5. ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DE LACTOFERRINA BUBALINA DAS FRAÇÕES SALINAS DOS PERFIS DE PRECIPITAÇÃO SALINA (<i>SALTING-OUT</i>) (PH 7, 290 NM). | 48 |
| FIGURA 6. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA ABSORVÂNCIA À 280 NM DE ELUIÇÃO DO PRECIPITADO RESSUSPENDIDO 40 – 60% (300 μ L) DURANTE A ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM COLUNA SEPHACRYL S-100. | 49 |
| FIGURA 7. ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES ELUIDAS E REUNIDAS DO PICO 1 (FRAÇÕES 12-16), PICO 2 (FRAÇÕES 17-22) E PICO 3 (FRAÇÕES 23-26) EM CROMATOGRAFIA FILTRAÇÃO EM GEL SEPHACRYL S – 100 (PH, 7; 290NM). | 50 |
| FIGURA 8. ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DOS PICOS 1 E 2 APÓS PASSAR NO CONCENTRADOR DE PROTEÍNAS. | 52 |
| FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO SDS- PAGE DA LACTOFERRINA BUBALINAS POR SEPHACRYL S-100:(A) GEL SDS – PAGE DE CONCENTRAÇÃO 8%: (LFS: LACTOFERRINA COMERCIAL SIGMA (16,80 μ G), WFB: SOBRENADANTE NEUTRALIZADO (6,06 μ G) E LFB: LACTOFERRINA BUBALINA PURIFICADA (13,42 μ G; (15,10 μ G)). | 53 |
| FIGURA 10. ESPECTRO UV-VISÍVEL DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES ELUIDA DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA SEPHACRYL S-100 DA LACTOFERRINA PURIFICADA (0,421 MG/ML), DO PRECIPITADO RESSUSPENDIDO DIALISADO 40-60% NA CONCENTRAÇÃO DE 0,421 MG/ML. | 55 |

FIGURA 11. ESPECTRO UV-VISÍVEL DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES ELUIDA DA CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA SEPHACRYL S-100 DA LACTOFERRINA PURIFICADA (0,421 MG/ML), AMOXICILINA ($2,5 \times 10^{-6}$ MOL.L⁻¹) E A LACTOFERRINA ACOPLADA COM A LACTOFERRINA.....56

FIGURA 12. ESPECTRO UV-VISÍVEL DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES ELUIDA DA CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA SEPHACRYL S-100 DA LACTOFERRINA PURIFICADA (0,421 MG/ML) E A LACTOFERRINA ACOPLADA COM A AMOXICILINA.....58

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| TABELA 1. PROPRIEDADES FÍSICAS E BIOQUÍMICAS DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE. | 19 |
| TABELA 2. COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS LF (1-11) EM LF DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MAMÍFEROS. | 25 |
| TABELA 3. COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA LACTOFERRICINA PARA DIFERENTES ESPÉCIES DE MAMÍFEROS..... | 26 |
| TABELA 4. RESINAS UTILIZADAS NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE PURIFICAÇÃO DE LACTOFERRINAS DE EQUINO, CAMELO, CAPRINO, BOVINO E HUMANO..... | 30 |
| TABELA 5. QUANTIDADE DE SULFATO DE SÓDIO PARA A PRECIPITAÇÃO SALINA..... | 40 |
| TABELA 6. BALANÇO DE MASSA DO PROCESSAMENTO DO LEITE DE BÚFALO. | 45 |
| TABELA 7. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NAS FRAÇÕES SALINAS NO PERFIL DE PRECIPITAÇÃO SALINA (<i>SALTING-OUT</i>). | 47 |
| TABELA 8. TEOR DE PROTEÍNAS DOS PICOS APÓS PASSAR EM CONCENTRADORES DE PROTEÍNAS..... | 51 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 | Importância do Leite na alimentação | 16 |
| 2.2 | Proteínas do soro leite | 18 |
| 2.3 | Lactoferrina: Propriedades estruturais | 21 |
| 2.4 | Atividade peptídica da lactoferrina | 23 |
| 2.4.1 | Lf 1-11 | 24 |
| 2.4.2 | Lactoferricina | 25 |
| 2.5 | Atividade antibacteriana da lactoferrina | 27 |
| 2.6 | Atividade antiviral | 27 |
| 2.7 | Atividade antifúngica | 28 |
| 2.8 | Purificação de lactoferrina de distintos mamíferos e suas aplicações | 29 |
| 2.9 | Técnicas de isolamento e purificação de proteínas | 31 |
| 2.9.1 | Técnica de precipitação salina (<i>salting-out</i>) | 31 |
| 2.9.2 | Cromatografia de proteínas e tipos de suportes | 32 |
| 2.10 | Fluorimetria de proteínas | 33 |
| 2.11 | Fluorimetria de lactoferrina | 35 |
| 3 | OBJETIVOS | 37 |
| 3.1 | Objetivo geral: | 37 |
| 3.2 | Objetivos específicos: | 37 |
| 4 | METODOLOGIA | 38 |
| 4.1 | Obtenção do leite | 38 |
| 4.2 | Processamento do leite | 38 |
| 4.3 | Protocolo de purificação por cromatografia | 40 |
| 4.3.1 | Precipitação salina (<i>salting-out</i>) | 40 |
| 4.3.2 | Purificação por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100) | 41 |
| 4.4 | Quantificação de proteínas | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5 | Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 43 |
| 4.6 | Estudos espectrofotométricos | 43 |
| 4.7 | Estudos fluorimétricos | 44 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 45 |
| 5.1 | Processamento do leite bubalino | 45 |
| 5.2 | Fracionamento da lactoferrina bubalina | 45 |
| 5.3 | Purificação por cromatografia líquida (Sephacryl S-100) | 49 |
| 5.4 | Eletroforese | 52 |
| 5.5 | Estudos espectrofotométricos | 54 |
| | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

1 INTRODUÇÃO

O leite é definido como um alimento completo de alto valor nutricional, por ser fonte considerável de proteínas de alto valor biológico, além de vitaminas e minerais. O consumo habitual deste alimento é recomendado, principalmente, para atingir a adequação diária de cálcio, um nutriente fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea, entre outras funções no organismo (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013).

Em média, o leite possui 87% de água e 13% de componentes sólidos, divididos entre cerca de 4% a 5% de carboidratos, 3% de proteínas, 3% a 4% de lipídios (em sua maior parte saturados), 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas. Além disso, este alimento possui naturalmente imunoglobulinas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, peptídeos, poliaminas, enzimas e outros peptídeos bioativos que apresentam interessantes efeitos à saúde (SBAN, 2015).

As proteínas do leite consistem em dois grupos principais de proteínas chamadas caseínas e proteínas do soro de leite. Dos cerca de 3,6% de proteína do leite, cerca de 80% é caseína e 20% é proteína do soro de leite (REBOUILLAT; ORTEGA-REQUENA, 2015).

As proteínas do soro e a caseína são frequentemente adicionadas a produtos alimentares devido às suas propriedades agregantes. O soro do leite contém quase a metade dos nutrientes originais do leite sendo rico em componentes tais como: proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis, sais minerais e lactose. As proteínas do soro são complexas misturas de numerosas moléculas, cujas principais são: β lactoglobulina, α lactalbumina, imunoglobulinas e albumina de soro (POPPI et al., 2010).

O alto valor nutricional das proteínas do soro é conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais. Os aminoácidos presentes nas proteínas do soro superam as doses recomendadas a crianças de dois a cinco anos e aos adultos, aspecto que torna esta fonte proteica a mais concentrada em aminoácidos essenciais em detrimento às demais fontes de proteínas (TERADA et al., 2009).

Em particular, o *whey protein*, tem demonstrado efeitos promissores em vários aspectos de saúde, como no ganho de massa muscular, no controle da obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2, podendo-se especular que estes últimos resultados se referem ao efeito sobre a saciedade desempenhada pelas proteínas presentes no de soro de leite (SBAN, 2015).

Dentre das inúmeras proteínas do leite tem se destacado a lactoferrina por ser uma proteína multifuncional, desempenhando vários papéis biológicos, tais como atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e imunomoduladoras. Além disso, essa enzima ajuda a estabelecer uma microflora favorável no tecido intestinais, conseqüentemente, promove o crescimento microbiano de bifidobactérias (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

A Lactoferrina inibe ou retarda o crescimento de bactérias com alto potencial para ser humano; entre elas: *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus mutans* e (OCHOA; CLEARY, 2009). Também mostra efeito bacteriostático contra o *Helicobacter pylori* e inibe o crescimento de alguns patógenos resistentes a antibióticos (NIBBERING et al., 2001). A Lf possui forte atividade antiviral contra um amplo espectro de vírus RNA e DNA, como vírus Sindbis (WAARTS et al., 2005), citomegalovírus (ANDERSEN et al., 2001; BELJAARS et al., 2004), vírus do herpes simplex (MARCHETTI et al., 2004), vírus da floresta Semliki (WAARTS et al., 2005), poliomavírus humano (LONGHI et al., 2006), papilomavírus humano (DROBNI; NÄSLUND; EVANDER, 2004), echovírus (AMMENDOLIA et al., 2007), vírus da imunodeficiência humana (PUDDU et al., 1998) e rotavírus (SUPERTI et al., 2001).

Tendo em vista as propriedades multifuncionais da lactoferrina (Lf) esse trabalho teve como objetivo comparar as técnicas de isolamento, fracionamento e purificação da lactoferrina bubalina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância do Leite na alimentação

O leite e seus derivados constituem um grupo de alimentos de grande valor nutricional, por serem fontes consideráveis de proteínas de alto valor biológico, além de vitaminas e minerais. O consumo habitual destes alimentos é recomendado, principalmente, para atingir a adequação diária de cálcio, um nutriente fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea, entre outras funções no organismo (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013).

A ingestão de cálcio recomendada a partir dos 20 anos de idade varia de 1.000 a 1.200 mg/dia, sendo, portanto, difícil atingir tal recomendação sem o consumo suficiente de laticínios. O Ministério da Saúde do Brasil, através de seu Guia Alimentar, recomenda o consumo diário de três porções de leite e/ou derivados¹, sendo esta quantidade suficiente para atender 75% das necessidades diárias de cálcio (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013).

O leite de vaca é composto de água (87,3%) e sólidos totais (12,7%), assim distribuídos: proteínas totais (3,3 a 3,5%), gordura (3,5 a 3,8%), lactose (4,9%), além de 0,7% de minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2005; YÜKSEL & ERDEM, 2009) (almedia). As proteínas do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Suas propriedades nutritivas e tecnológicas derivam da composição dos aminoácidos que atendem a maioria das exigências fisiológicas do ser humano (HUFFMAN, 1996; SGARBIERI, 2005).

Os mamíferos alimentam seus bebês com leite durante o período antes que eles sejam capazes de se alimentar por conta própria. O leite também é um mecanismo pelo qual a mãe pode proteger contra infecções as superfícies mucosas de seus bebês imunologicamente inexperientes. Além disso, o leite materno molda a aquisição e o desenvolvimento de bactérias, arqueias, vírus, protistas e fungos, chamados coletivamente de microbioma, que colonizam nossas superfícies de barreira. A composição do microbioma é adaptada a determinados locais e funções do tecido (GOPALAKRISHNA; HAND, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o aleitamento materno exclusivo para bebês, pois fornece todos os nutrientes necessários ao crescimento da criança nos primeiros 6 meses de vida e ao aleitamento materno com suplementação alimentar até os 2 anos de idade. A colonização inicial do trato gastrointestinal do bebê com o microbioma possa ser volátil, há um caminho característico para o desenvolvimento do microbioma nascente após o nascimento, moldado por componentes do leite materno. Embora a amamentação provavelmente tenha efeitos nas comunidades microbianas fora do trato gastrointestinal, os efeitos mais óbvios e profundamente estudados são na microbiota intestinal (GOPALAKRISHNA; HAND, 2020).

Durante o processo de digestão, a maioria das proteínas é decomposta em aminoácidos livres que são absorvidos e utilizados como blocos de construção para sintetizar novas proteínas no corpo (MOSCA; GIANNÌ, 2017).

As proteínas representam o terceiro sólido abundante no leite humano, fornecendo não apenas nutrição, mas também desempenhando várias funções bioativas. Na verdade, as proteínas são essenciais para permitir o crescimento saudável dos bebês, mas também atuam como transportadores de outros nutrientes (ou seja, lactoferrina, haptocorrina, alfa-lactalbumina, proteína de ligação do folato, beta-caseína), promovem o desenvolvimento intestinal (fatores de crescimento, lactoferrina) e absorção de nutrientes (lipase estimulada por sais biliares, amilase, alfa-1-antitripsina) e possuem atividade imunológica e antimicrobiana (lactoferrina, IgA secretora, osteopontina, citocinas, lisozima, etc.) (HASCHKE; HAIDEN; THAKKAR, 2017). As proteínas do leite podem ser agrupadas em três classes principais: caseínas, soro de leite e mucinas. As caseínas são montadas em micelas, enquanto as proteínas do soro do leite estão presentes na solução. As principais proteínas do soro são representadas por alfa-lactalbumina, lactoferrina, lisozima e IgA secretora (MOSCA; GIANNÌ, 2017).

Evidências crescentes indicam que a quantidade e a qualidade da proteína do leite humano desempenham um papel crucial na modulação do crescimento infantil e da composição corporal. Uma alta ingestão de proteínas na infância tem sido associada a um aumento do ganho de peso e risco de desenvolver obesidade mais

tarde na vida por meio da ativação do eixo do fator de crescimento semelhante à insulina-1.

De acordo com Luca et al. (2016), o leite materno maduro de mães obesas (índice de massa corporal = $34,3 \pm 3,9$ kg / m²), continha uma quantidade maior de aminoácidos de cadeia ramificada (+ 20%) e tirosina (+ 30%) em comparação com o leite maturo de mães não obesas (índice de massa corporal = $21,6 \pm 1,4$ kg / m²).¹⁵ Uma vez que altas concentrações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada parecem inibir a oxidação de ácidos graxos livres e, portanto, promover a deposição de gordura, 16 esses achados precisam de esclarecimento adicional em termos de potencial implicação clínica, no que diz respeito à programação metabólica em lactentes (MOSCA; GIANNÌ, 2017).

2.2 Proteínas do soro leite

O soro é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos, considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica. Assim, o seu reaproveitamento tem sido estudado e sugerido para melhorar a eficiência econômica dos laticínios e minimizar os impactos ambientais. Cerca de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, o qual contém, aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente lactose (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

O soro de leite contém, em média, 93% de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas. A fração protéica contém, aproximadamente, 50% de b-lactoglobulina, 25% de a-lactoalbumina e 25% de outras frações protéicas, incluindo imunoglobulinas. As frações do soro são constituídas de: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, caseína do soro, lipoproteínas, lactoferrina, lactoperoxidase e glico-macropéptídeos (**Tabela 1**). Essas frações, no entanto, podem variar em tamanho, peso molecular e função (SGARBIERI, 2004). Apesar de existir uma elevada variedade de proteínas presente no soro do leite, as propriedades dos concentrados protéicos do soro são principalmente relacionadas com as propriedades da β -lactoglobulina.

Sob o ponto de vista nutricional, o soro de leite é considerado levemente superior comparado à caseína, que possui quantidade limitada dos aminoácidos sulfurados (metionina e cistina), além de ter alto conteúdo dos aminoácidos essenciais, especialmente lisina, treonina, triptofano, fenilalanina e tirosina e a presença da proteína superior lactalbumina (ALMEIDA et al., 2013).

Tabela 1. Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro do leite.

| Proteína | Massa Molar (kDa) | Ponto Isoelétrico | Concentração (g.L⁻¹) |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| β-Lactoglobulina | 18,4 | 5.2 | 2,70 |
| α-Lactoalbumina | 14-15 | 4.2-4.8 | 1,20 |
| Albumina do soro bovino | 69 | 4.7-4.9 | 0,4 |
| Imunoglobulina | 15-1000 | 5.5-8.3 | 0,65 |
| Lactoferrina | 78 | 8.0-9.0 | 0,1 |
| Lactoperoxidase | 89 | 9.5 | 0,02 |

Fonte: adaptado de Poppi et al., (2010).

O papel nutricional das proteínas dos alimentos tem sido bem estudado e é amplamente conhecido. A atenção dos pesquisadores em estudos sobre a utilização de proteínas como ingredientes funcionais é crescente, a exemplo disso, existem no mercado internacional produtos lácteos comerciais e ingredientes com apelo funcional baseado em peptídeos bioativos obtidos das proteínas do leite (caseínas e soro-proteínas). Em muitos casos é possível, ao empregar as proteínas como agentes funcionais, desenvolver produtos com características especiais e agregar valor à subprodutos os quais em geral representam um problema para as indústrias (ALMEIDA et al., 2013; OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

A utilização industrial desse subproduto tem contribuído para o enriquecimento e desenvolvimento de novos produtos alimentícios, a exemplo cita-se a produção de bebidas lácteas enriquecidas com proteínas e sais minerais de soro de leite. A qualidade biológica das proteínas e o teor de minerais e vitaminas presentes no soro de leite fazem dele um produto atrativo para a indústria de alimentos destinados ao consumo humano e animal. Como resultado da utilização integral do soro de leite, tem-se conseguido a redução da poluição ambiental, vendas adicionais de produtos

como proteína de soro, creme de soro, lactose, minerais do leite, além de outros novos produtos à base de soro de leite, como a obtenção de filmes transparentes comestíveis utilizando isolado protéico, que têm sido desenvolvidos (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

O interesse da população por uma vida mais saudável vem crescendo nos últimos anos. Esta tendência está acompanhada do aumento da procura por alimentos com propriedades funcionais. Entre os mais recentes, encontram-se os suplementos nutricionais à base da proteína do soro do leite bovino, mais conhecidos como *whey protein*, cujo efeito, segundo alguns autores, ocorre através do estímulo à síntese protéica devido ao maior aporte de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004).

O *Whey protein* é composto por vários peptídeos, dos quais temos as imunoglobulinas, beta-lacto globulina, alfa-lactalbumina, albumina do soro bovino e glicomacropéptídeos. O *whey protein*, uma das mais ricas fontes de precursores da glutatona, é um dos mais utilizados. Bem como, é composto por proteínas extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo. O perfil de aminoácidos das proteínas do soro, principalmente ricas em leucina, pode favorecer o anabolismo muscular (FISCHBORN, 2009; HA; ZEMEL, 2003; HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

Outra característica marcante do *Whey protein* é sua alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada em comparação com outras fontes proteicas, especialmente a leucina, objeto de estudo de investigações devido sua capacidade de ativar vias metabólicas responsáveis pela síntese proteica (ALVES DE SANTANA, 2014).

O perfil de aminoácidos das proteínas do soro, principalmente ricas em leucina, pode, desta forma, favorecer o anabolismo muscular. Além disso, destacam que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro é muito similar ao das proteínas do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção similar às do mesmo, classificando-as como um efetivo suplemento anabólico (HA; ZEMEL, 2003).

O conceito de proteínas com diferentes velocidades de absorção tem sido, recentemente, utilizado por profissionais e cientistas que trabalham com desempenho físico. Estudos demonstram que as proteínas do soro são absorvidas mais rapidamente que outras, como a caseína, por exemplo. Essa rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, inclusive a leucina, atinjam altos valores logo após a sua ingestão. Pode-se, dessa forma, hipotetizar que, se essa ingestão fosse realizada após uma sessão de exercícios, as proteínas do soro seriam mais eficientes no desencadeamento do processo de síntese protéica. Além de aumentar as concentrações plasmáticas de aminoácidos, a ingestão de soluções contendo as proteínas do soro aumenta, significativamente, a concentração de insulina plasmática, o que favorece a captação de aminoácidos para o interior da célula muscular, otimizando a síntese e reduzindo o catabolismo protéico (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

A maioria dos estudos revela que a suplementação de *Whey* é eficaz em estimular o aumento da síntese proteica, mantendo um balanço nitrogenado positivo (ALVES DE SANTANA, 2014; FISCHBORN, 2009).

2.3 Lactoferrina: propriedades estruturais.

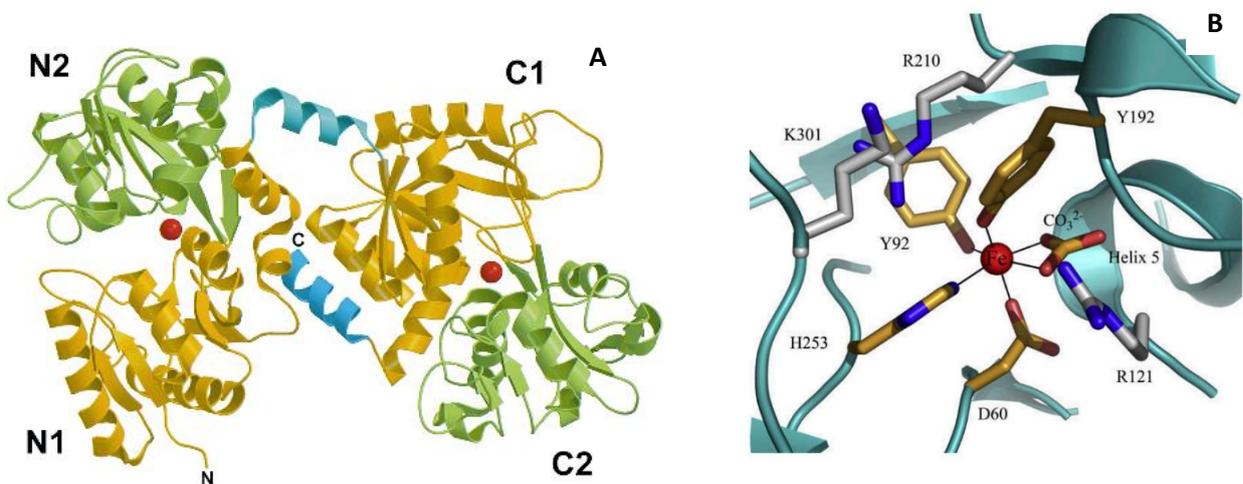
A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína multifuncional com massa molecular de cerca de 80 KDa pertencente à família das transferrinas (Tfs), que tem uma habilidade específica de realizar ligação com o íon ferro (LEGRAND et al., 2008). A Lf é excretada pelas células epiteliais da mucosa e neutrófilos em várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, bovinos, vacas, cabras, equinos, cães e vários roedores (GIANSANTI et al., 2016) . Essa enzima também é encontrada em secreções de mamíferos como leite, colostro, lágrimas, saliva, líquido nasal e brônquico, bile hepática, estômago, intestinos e urina (ELNAZ et al., 2016; GARCÍA-MONTOYA et al., 2012; FARNAUD; EVANS, 2003).

A determinação da sequência de aminoácidos para as Lfs de nove espécies: humano (*Homo sapiens*), suína (*Sus scrofa domesticus*), equina (*Equidae*), bovina (*Bovinae*), búfalo (*Bubalus*), ovelha, cabra (*capra aegagrus hircus*), camelo (*Camelus*) e camundongo (*Mus musculus*); verificou-se que as identidades de sequência em pares variam de um mínimo de ~ 65% a quase 100%. Os principais discrepantes

nesse grupo são Lf humano e Lf de camundongo; estes têm 70-74% e 65-70% de identidade, respectivamente, com as outras Lfs estudadas. Por outro lado, Lfs de vaca, búfalo, cabra e ovelha compartilham mais de 90% de identidade de sequência entre si e formam um grupo extremamente estreitamente relacionado (BAKER; BAKER, 2005). As relações de sequência de aminoácidos fornecidas acima mostram que as Lfs formam uma família de sequências altamente conservada, mas a identidade da sequência entre Lfs e Tfs não é muito menor, de 60 a 65% (BAKER; BAKER, 2012).

A cadeia polipeptídica de aminoácidos de lactoferrina é composta de estruturas de folhas com hélice e com pregas que criam dois domínios para cada lobo (domínios I e II) (**Figura 1 A**) (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009; MAZURIER; SPIK, 1980). Os lobos N e C possui sítios de ligação ao íon Fe^{3+} sinergicamente com o íon carbonato (CO_3^{2-}). Os quatro ligantes de proteínas, mais o ânion CO_3^{2-} ligado de forma sinérgica, são ligados covalentemente ao íon metálico, que reticula os dois domínios que o envolvem. Os aminoácido que contribuem para a ligação dos íons férricos na fenda são Asp-60, Tyr-92, Tyr-192 e His-253 no lobo N (**Figura 1 B**) e Asp-395, Tyr-433, Tyr-526 e His-595 no lóbulo C, enquanto Arg está envolvido na ligação com o íon CO_3^{2-} (BAKER; BAKER, 2005; STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000). Estes quatro ligantes de proteína (2 Tyr, 1 Asp, 1 His) fornecem três cargas negativas para equilibrar a carga 3+ de Fe^{3+} , juntamente com um terminal N em hélice e a cadeia lateral Arg cuja carga positiva equilibra a carga negativa no CO_3^{2-} ânion (BAKER; BAKER, 2005).

Figura 1 (A). Modelo de predição da estrutura molecular de uma lactoferrina do leite humano com ligação ao ferro e com o lobo N à esquerda e o lobo C à direita. Em cada lóbulo, o domínio 1 está em ouro e o domínio 2 está em verde. A α -hélice que une os dois lobos está em ciano. A hélice do terminal C, que pode mediar interações cooperativas entre os lobos, está em azul escuro. Os dois íons Fe^{3+} , ligados na fenda interdomínio de cada lobo, são mostrados como esferas vermelhas. **FIGURA 1 (B):** Sítio de ligação ao ferro da lactoferrina. Sítio de ligação do ferro no lobo N: duas tirosinas (Y92 e Y192), um ácido aspártico (D60), uma histidina (H253) e um ânion carbonato (CO_3^{2-}) juntamente com o resíduo de arginina (R121). Dois resíduos básicos atrás do local do ferro, uma arginina (R210) e uma lisina (K301) ajudam a modular a liberação de ferro.



Fonte: Baker; Baker; Kidd, (2002).

2.4 Atividade peptídica da lactoferrina

A lactoferrina exerce sua ação antimicrobiana não apenas na forma de molécula intacta, mas os lobos monoférricos e os peptídeos ativos da lactoferrina também desempenham um papel na defesa do hospedeiro contra doenças microbianas (LIZZI et al., 2009). A lactoferrina é uma fonte rica de peptídeos antimicrobianos catiônicos e hidrofóbicos, que podem ser usados contra micróbios. Esses peptídeos antibacterianos que são parte da cadeia polipeptídica da lactoferrina e são liberados na proteólise desta molécula por várias enzimas proteolíticas podem ser desenvolvidos em moléculas principais clinicamente úteis para a terapêutica antimicrobiana (SINHA et al., 2013).

Vários peptídeos funcionais são produzidos a partir de Lf pela ação de enzimas proteolíticas, e muitos peptídeos antimicrobianos derivados de Lf foram isolados e caracterizados. Três peptídeos foram estudados com algum detalhe (BRUNI et al., 2016; SINHA et al., 2013). Estes são LF1-11, lactoferrampina e lactoferricina. As

sequências destes peptídeos indicam que estes peptídeos pertencem à metade N-terminal da lactoferrina (Figura 6). Hidrofobicidade, cationicidade e conformação helicoidal desses peptídeos antimicrobianos são as características importantes que determinam sua potência antimicrobiana (VOGEL et al., 2002). Todos esses peptídeos têm altos valores de pI (> 9) e espera-se que interajam com elementos carregados negativamente. A maioria deles causa despolarização da membrana (como os antibióticos colistina e polimixina B). Entretanto, mecanismos complexos, como a inibição da síntese de macromoléculas e ação sinérgica com compostos da imunidade inata do hospedeiro também foram descritos (BRUNI et al., 2016).

2.4.1 Lf 1-11

Lf (1–11) é o oligopeptídeo que inclui os primeiros onze resíduos de aminoácidos da molécula Lf. A comparação da sequência de Lf (1-11) de seis espécies de mamíferos (**Tabela 2**) mostra que algumas características importantes, como a natureza altamente catiônica do peptídeo, são mantidas (pI > 11, variando de 11,70 (bovino) a 12,5 (humano) e os resíduos hidrofóbicos valina e triptofano V6 e W8 são conservados em todas as espécies.

Seguindo os resultados antifúngicos *in vitro* e a atividade *in vivo* de hLf (1-11) contra *C. albicans* resistente ao fluconazol foi investigada usando camundongos neutrociopênicos infectados com *C. albicans* Y01-19. Uma redução dos sinais e sintomas clínicos da infecção foi observada com uma dose de 0,4 µg / kg de peso corporal, muito menor do que a encontrada em experimentos *in vitro* (BROUWER; RAHMAN; WELLING, 2011). A explicação mais provável para o nivelamento dos efeitos antifúngicos do hLf (1–11) é que o peptídeo induz múltiplos processos que contribuem de forma diferente para sua atividade antifúngica (BRUNI et al., 2016).

O mecanismo de ação antifúngica de LF1-11 pode ser devido aos danos mitocondriais, com o ATP extracelular sendo essencial, mas não suficiente para LF1-11 exercer sua atividade candidacida. Em estudos posteriores, descobriu-se que a absorção de cálcio pelas mitocôndrias é vital para matar *Candida albicans* pelo LF1-11 (SINHA et al., 2013).

Tabela 2. Comparação da sequência de aminoácidos Lf (1-11) em Lf de diferentes espécies de mamíferos.

| Espécies | Nome popular | Sequências |
|------------------------------|--------------|-------------|
| <i>Homo sapiens</i> | Humana | GRRRSVQWCAV |
| <i>Bovinae</i> | Bovina | APRKNVRWCTI |
| <i>Bubalus</i> | Búfalo | APRKNVRWCTI |
| <i>Equidae</i> | Equino | APRKSVRWCTI |
| <i>Capra aegagrus hircus</i> | Cabra | APRKNVRWCAI |
| <i>Camelus</i> | Camelo | ASKKSVRWCTT |

Para os diferentes aminoácidos, as cores indicam: azul = carga positiva (R, K, H); preto = carregado negativamente (D, E); vermelho = hidrofóbico (I, L, V, A, P, M, F, Y, W); verde = hidrofílico (S, T, E, Q, N, C e G).

Fonte: adaptado de Bruni et al., (2016).

A importância das três argininas (R2-R4) para a potente atividade antimicrobiana deste peptídeo foi estabelecida quando os peptídeos sintéticos sem os primeiros três resíduos N-terminais foram considerados menos eficazes na morte de bactérias (SINHA et al., 2013).

2.4.2 Lactoferricina

Lactoferricina (Lficin) é um peptídeo multifuncional de 25 resíduos gerado após a clivagem da lactoferrina nativa pela pepsina e representa os resíduos de aminoácidos 17-41 na lactoferrina. O péptido lactoferricina é diferente dos outros péptidos descritos, na medida em que contém uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys 20 e Cys 37 na lactoferrina humana e Cys 19 e Cys 36 na lactoferrina bovina. O peptídeo possui uma abundância de aminoácidos básicos como lisina e arginina, bem como resíduos hidrofóbicos como triptofano e fenilalanina (SINHA et al., 2013).

A Lactoferricina bovina (bLficin) quanto a lactoferricina humana (hLficin) existem como uma α -hélice anfipática em Lf, mas, após a digestão com pepsina, a primeira é transformada em grampo de folha β anfipática em um ambiente aquoso, enquanto o último (modelo mais volumoso) também possui uma folha β paralela que é perdido após a digestão, preservando a α -hélice. A retenção da região α - helicoidal em hLficin pode estar diretamente relacionada ao comprimento adicional do peptídeo. A **Tabela**

3 mostra a estrutura de Lfcin de diferentes origens. A sequência atual de hLfcin contém este loop, mas, neste caso, uma segunda ligação dissulfeto estende a estrutura geral, que é cerca de duas vezes mais longa que a bLfcin. hLfcin é composto por dois fragmentos correspondentes a 1-11 e 12-47 conectados por uma ponte dissulfeto (BRUNI et al., 2016; HUNTER et al., 2005).

Tabela 3. Comparação da sequência de aminoácidos da lactoferricina para diferentes espécies de mamíferos.

| Espécies | Nome popular | Sequências |
|-----------------------|--------------|---------------------------|
| <i>Homo sapiens</i> | Humana | TKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDS |
| <i>Bovinae</i> | Bovina | FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF |
| <i>Bubalus</i> | Búfalo | LKCHRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF |
| <i>Equidae</i> | Equino | AKCAKFQRNMKKVRGPSVSCIRKTS |
| <i>Capra aegagrus</i> | | |
| <i>hircus</i> | Cabra | SKCYQWQRRMRKLGAPSITCVRRTS |
| <i>Camelus</i> | Camelo | KKCAQWQRRMKKVRGPSVTCVKKTS |

Para os diferentes aminoácidos, as cores indicam: azul = carga positiva (R, K, H); preto = carregado negativamente (D, E); vermelho = hidrofóbico (I, L, V, A, P, M, F, Y, W); verde = hidrofílico (S, T, E, Q, N, C e G).

Fonte: adaptado de Bruni et al., (2016).

A lactoferricina é um peptídeo potente como agente antibacteriano em comparação com a lactoferrina intacta e demonstrou causar uma rápida perda da capacidade de formação de colônias na maioria de seus alvos. No entanto, algumas cepas como *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecalis* e *Bifidobacterium bifidum* foram consideradas resistentes à lactoferricina (SINHA et al., 2013). A atividade antibacteriana deste peptídeo foi atribuída à sua ação de liberação de lipopolissacarídeo de cepas bacterianas e, portanto, a interrupção da permeabilidade da membrana citoplasmática após a ligação celular (FLORES-VILLASEÑOR et al., 2010). Além de ter um amplo espectro antibacteriano, a lactoferricina foi considerada altamente potente contra *Candida albicans* (MURATA et al., 2013). Recentemente, também foi demonstrado que tem atividades antivirais e antiprotozoárias. Ele também exibiu outras atividades como inibição de metástases tumorais e indução de apoptose em células leucêmicas humanas (BRUNI et al., 2016).

2.5 Atividade antibacteriana da lactoferrina

A atividade antibacteriana do Lf tem sido amplamente documentada *in vitro* e *in vivo* para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em algumas bactérias resistentes ao álcool-ácido.

A Lf inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Listeria monocytogenes* (RIPOLLES et al., 2015), *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (BRANEN; DAVIDSON, 2000), *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (RAMOS-CLAMONT et al., 2010). Também possui efeito bactericida e bacteriostático *in vivo* e em modelos animais contra múltiplas cepas de *Helicobacter pylori*. É importante destacar que Lf também atua nas cepas resistentes a antibióticos de *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* resistentes à metacilina, *Klebsiella pneumoniae* resistente à meticilina e *Mycobacterium tuberculosis*, (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005). Também se demonstrou que a Lf é eficaz contra cepas de *Haemophilus influenzae* que podem se ligar à célula hospedeira (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009; JENSSEN; HANCOCK, 2009; MORENO-EXPÓSITO et al., 2018).

2.6 Atividade antiviral

Além de possuir uma atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias e fungos, a lactoferrina é capaz de inibir a replicação de uma ampla gama de vírus.

Estudos vem indicando que a Lf possui forte atividade antiviral contra um amplo espectro de vírus RNA e DNA, como vírus Sindbis (WAARTS et al., 2005), citomegalovírus (ANDERSEN et al., 2001; BELJAARS et al., 2004), vírus do herpes simplex (MARCHETTI et al., 2004), vírus da floresta Semliki (WAARTS et al., 2005), poliomavírus humano (LONGHI et al., 2006), papilomavírus humano (DROBNI; NÄSLUND; EVANDER, 2004), echovírus (AMMENDOLIA et al., 2007), vírus da imunodeficiência humana (PUDDU et al., 1998) e rotavírus (SUPERTI et al., 2001). A

maioria desses estudos sugere que Lf inibe a entrada do vírus na célula hospedeira, em vez de agir em sua replicação.

Wong et al. (2014), demonstrou que a Lf possui uma poderosa atividade inibitória contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), enquanto alguns fragmentos de LF, como a lactoferricina, exercem uma ação inibitória leve na transcriptase reversa do HIV-1 e na integrase do HIV-1. De acordo com Carthage (2011), a LF pode interferir na transmissão do HIV-1 no nível da mucosa, bloqueando sua ligação às células epiteliais e com a transmissão das células dendríticas às células T CD4⁺, duas etapas cruciais na difusão do HIV da mucosa para o tecido linfóide.

Um segundo mecanismo é bloquear moléculas na superfície celular, que o vírus reconhece como receptores ou correceptores. Esses vírus normalmente utilizam moléculas comuns na membrana celular para facilitar sua invasão nas células. Essas moléculas, incluindo os proteoglicanos heparano sulfato (HSPGs), fornecem os primeiros locais de ancoragem na superfície celular e ajudam o vírus a fazer contato primário com as células hospedeiras (BELTING, 2003).

2.7 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica de amplo espectro da Lf ou suas frações contra leveduras e bolores está bem documentada (SILVA et al., 2013; VAN DER DOES et al., 2012). A atividade antifúngica, inibe o crescimento de diferentes fitopatógenos, como *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* (LAHOZ et al., 2008), de fungos dermatofíticos como *Trichophyton mentagrophytes* (FERNANDES; CARTER, 2017; SHARMA et al., 2019) e inibe a germinação de esporos e o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em um período de tempo e dose dependente (WANG et al., 2013). Entretanto, a maioria dos estudos sobre a atividade antifúngica de Lf foi realizada com espécies do gênero *Candida*, mais amplamente estudada é a sua atividade em membros das espécies de *Candida*, com *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida albicans* exibindo o maior nível de suscetibilidade, enquanto *Candida glabrata* tem o menor (FERNANDES; CARTER, 2017), provavelmente devido ao fato de a maioria das espécies serem patógenos humanos (ACOSTA-ZALDÍVAR et al., 2016).

2.8 Purificação de lactoferrina de distintos mamíferos e suas aplicações

A Lf tem sido purificada de vários mamíferos, como a LF de leite humano (MORADIAN; SHARBAFI; RAFIEI, 2014; YUGIS et al., 2015), Lf bovina e do colostro bovino (TITOV et al., 2016; WU; XU, 2009), Lf suína (CLAMONT, et al. 2010), Lf de camelo (RAEI et al., 2015), Lf de cabra (ABBAS; DOOSH; YASEEN, 2015) (**Tabela 4**).

A Sephadex G-75 e a Sephadex g-100 são úteis no trabalho com proteínas e outras macromoléculas onde sua estabilidade física relativamente pobre não é um obstáculo. A resina Sephadex G-75 é para purificação de moléculas é um meio de filtração em gel usado em cromatografia de filtração em gel e cromatografia de proteínas. O uso da Sephadex G-75 são a dessalinização, remoção de contaminantes e transferência rápida para um novo tampão em uma única etapa. Adequado para troca de tampão e limpeza de grandes biomoléculas com peso molecular até 80KDa. A Sephadex G-75 tem sido usada para estudar a cistatina do cérebro de mamíferos e para purificar metaloproteinase pró-coagulante do veneno de cascavel (STELLWAGEN, 2014).

A Sephadex G-100 é um meio de filtração em gel usado em cromatografia de proteínas, cromatografia de afinidade e cromatografia de filtração em gel. É um meio de filtração em gel frequentemente citado para dessalinização e troca de tampão de moléculas muito grandes. Preparado reticulando dextrano com epícloridrina. Os produtos da Sephadex diferem em seu grau de reticulação e, portanto, em seu grau de intumescimento e na faixa de fracionamento molecular. A faixa de fracionamento simples é adequada para purificação de DNA em coluna de rotação (de pequenas moléculas contaminantes) para uso em hibridizações. Foi utilizado para purificar a enzima polifenoloxidasas isolada de banana por filtração em gel. A faixa de fracionamento médio é indicada para “Médio” indica um grande tamanho de partícula para uso em separações de grupos em grande escala, onde altas taxas de fluxo e baixas pressões operacionais são necessárias. O Superfino é um meio de filtração em gel usado em cromatografia de proteínas, cromatografia de afinidade e cromatografia de filtração em gel (STELLWAGEN, 2014).

A lactoferrina humana e bovina tem regiões de peptídeo catiônico fortes que são responsáveis por uma série de características de ligação importantes (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000). A purificação da Lf realizada com Sephadex G-75 (gel – filtração) que tem a capacidade de separar moléculas com peso molecular na faixa de 3-80 kDa. Observou-se nesse estudo, a partir do perfil de eletroforegrama que a fração de purificação usando Sephadex G-75 é capaz de separação de proteínas com peso molecular na faixa de 80 kDa. No entanto, ainda não está completamente purificado devido à separação ser baseada apenas no peso molecular, não na carga de proteína. Neste mesmo estudo, realizou a purificação da Lf com Sephadex G-100 que separa moléculas na faixa de peso de 4-150 kDa, onde mostrou que não havia banda na faixa de 80 kDa. Isso pode ser devido às moléculas da faixa de peso da Sephadex G-100 serem muito grandes. A desvantagem do uso de acondicionamento manual também pode ser prejudicada no processo de purificação, visto que era difícil determinar a liberação de Lf da resina (YUGIS et al., 2015).

Tabela 4. Resinas utilizadas na cromatografia líquida de purificação de lactoferrinas de equino, camelo, caprino, bovino e humano.

| Origem | Coluna | Capacidade | Técnica | Referências |
|-------------------------------------|------------------|--------------|---------------|------------------------------------|
| Lactoferrina de equino | Sephadex G-100 | 4 a 150 KDa | Gel Filtração | (KIM et al., 2009) |
| Lactoferrina de caprino | Sephadex G-75 | 1 a 80 KDa | Gel Filtração | (YUGIS et al., 2015) |
| Lactoferrina do colostro de caprino | Sephadex G-100 | 4 a 150 KDa | | |
| Lactoferrina do colostro de caprino | CM Sephadex C-50 | 30 A 100KDa | Troca Iônica | (ABBAS; DOOSH; YASEEN, 2015) |
| Lactoferrina do colostro de bovino | CM Sephadex C-50 | 30 a 100 Kda | Troca Iônica | (MORADIAN; SHARBAFI; RAFIEI, 2014) |
| Lactoferrina de caprino | CM Sephadex C-50 | 30 a 100 Kda | Troca Iônica | (VIJAYAN et al., 2017) |

Fonte: Autor, (2021).

Kim et al., (2009) realizou a purificação da lactoferrina de equinos por cromatografia em duas etapas. A cromatografia de lactoferrina de equinos em

Sephadex G-100 resultou em 3 picos e após análise de SDS-PAGE as frações contendo lactoferrina (15-28 frações) foram reunidas e aplicadas na coluna Toyopeal-AF-Heparin-650m (cromatografia por afinidade) que resultou em 3 picos. Após a análise de SDS-PAGE obteve o peso molecular para a lactoferrina de égua da Mongólia de 81 kDa aproximado ao peso molecular de 82 kDa da lactoferrina.

2.9 Técnicas de isolamento e purificação de proteínas

2.9.1 Técnica de precipitação salina (*salting-out*)

O mecanismo de precipitação salina (*salting-out*) é baseado na solvatação preferencial devido à exclusão do co-solvente (sal) da camada de água intimamente associada com a superfície da proteína (camada de hidratação). A camada de hidratação, normalmente 0,3 a 0,4 g de água por grama de proteína que desempenha um papel crítico na manutenção da solubilidade e da conformação nativa corretamente dobrada (WINGFIELD, 1998).

Esse ordenamento das moléculas de água resulta em uma perda de entropia e, portanto, é energeticamente desfavorável. Quando o sal é adicionado à solução, a tensão superficial da água aumenta, resultando em maior interação hidrofóbica entre a proteína e a água. A proteína responde a essa situação diminuindo sua área de superfície em uma tentativa de minimizar o contato com o solvente - conforme manifestado pelo dobramento e, então, a auto-associação levando à precipitação. Tanto o dobramento quanto a precipitação liberam água retida, aumentando a entropia do sistema e tornando esses processos energeticamente favoráveis (WINGFIELD, 1998).

O aumento da tensão superficial da água pelo sal segue a conhecida série Hofmeister. Consequentemente, como uma aproximação, os sais que favorecem a salinização aumentam a tensão superficial da água ao máximo. A sequência estabelecida para os ânions ordenados da maior para a menor precipitação é $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- \approx \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$, e para cátions: $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (HYDE et al., 2017).

O sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, é frequentemente usado para precipitação salina (*salting-out*) por causa de sua alta solubilidade, que permite soluções de força

iônica muito alta, baixo preço e disponibilidade de material puro. Além disso, NH_4^+ e SO_4^{2-} estão no início de suas respectivas séries Hofmeister e mostraram estabilizar a estrutura da proteína (BURGESS, 2009).

A principal deficiência de usar a precipitação salina (*salting-out*) para purificar proteínas, no entanto, é que os contaminantes frequentemente precipitam com a proteína de interesse. Para obter uma amostra de proteína pura, são necessárias outras etapas de purificação, como cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel. Além disso, a proteína está em uma alta concentração de sal no final do experimento. A diálise é geralmente o melhor método para remover $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de uma amostra. Aplicar uma amostra com uma alta concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a uma coluna de dessalinização é desaconselhável, pois isso pode causar a compressão do meio da coluna (DUONG-LY; GABELLI, 2014).

2.9.2 Cromatografia de proteínas e tipos de suportes

A cromatografia de troca iônica é uma técnica de purificação bastante utilizada quando a composição da proteína é parcial ou totalmente conhecida. Nesse ponto é importante considerar o potencial isoelétrico (pI) da molécula a ser purificada. Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem esta técnica que é baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devida a diferenças de carga, sendo possível controlá-la por pH e força iônica (FERRARI et al., 2010).

A cromatografia líquida de proteínas é a técnica de isolamento mais empregada atualmente. As proteínas são purificadas usando técnicas de cromatografia que as separam de acordo com as diferenças em suas propriedades específicas, como tamanho, hidrofobicidade, carga, biorreconhecimento (especificidade do ligante) e ponto isoelétrico (REILAND, 1971).

Essa técnica também tem sido frequentemente referida por vários outros nomes, incluindo permeação de gel, exclusão de gel, exclusão de tamanho e cromatografia de peneira molecular. O princípio básico da filtração em gel é bastante direto. As moléculas são particionadas entre uma fase móvel e uma fase estacionária

(compreendendo uma matriz porosa de porosidade definida) em função de seus tamanhos relativos. Uma coluna construída de tal matriz, normalmente em forma de grânulo, terá dois volumes de líquido mensuráveis, o volume externo, que consiste no líquido entre os grânulos, e o volume interno, que consiste no líquido dentro dos grânulos. Após a aplicação da amostra, moléculas maiores do que os poros da matriz de fase estacionária serão excluídas do volume interno dentro dos grânulos e, portanto, migrarão muito rapidamente através da coluna. Enquanto as moléculas são menores do que os poros da matriz, assim como aqueles de tamanho intermediário, se equilibrarão com os volumes de líquido externo e interno, fazendo com que eles migrem muito mais lentamente. As moléculas são, portanto, eluídas em ordem decrescente de tamanho molecular. O volume de eluição de uma molécula particular depende da fração da fase estacionária disponível para a difusão (Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2017).

A cromatografia de gel filtração pode ser aplicada por duas maneiras distintas. A primeira aplicação da cromatografia de gel filtração é para separações de grupos, em que, os componentes de uma amostra são separados em dois grupos principais de acordo com a faixa de tamanho, ou seja, é uma separação de grupo pode ser usada para remover contaminantes de alto ou baixo peso molecular ou para dessalinização e troca de tampão. A segunda aplicação é no fracionamento de alta resolução de biomoléculas: os componentes de uma amostra são separados de acordo com as diferenças em seu tamanho molecular (REILAND, 1971).

A cromatografia de afinidade é um dos métodos de separação mais seletivos para proteínas. Embora fosse usada somente ocasionalmente como uma técnica intermediária para isolar proteases de veneno, tem sido utilizada extensivamente para remover impurezas restantes em amostra, e também tem sido acoplada a outros métodos de detecção. Além do seu interesse tecnológico, esta técnica é um instrumento excelente para compreender os mecanismos que são a base da interação da enzima e do inibidor (FERRARI et al., 2010).

2.10 Fluorimetria de proteínas

A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância, e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. A luminescência é formalmente dividida em

duas categorias - fluorescência e fosforescência – dependendo da natureza do o estado de excitação. Em estados singlet excitados, o elétron no orbital excitado é emparelhado (por rotação oposta) ao segundo elétron no orbital do estado fundamental. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido pelo spin e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton. As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente 10^8 s^{-1} , de modo que um tempo de vida típico da fluorescência é próximo a 10 ns ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$) (LAKOWICZ, 2006).

Vários ensaios fluorescentes para quantificação de proteínas foram desenvolvidos na tentativa de aliviar as dificuldades apresentadas ao usar ensaios baseados em absorvância (HELD, 2006). As moléculas de proteínas carboniladas podem ser analisadas por uma série de técnicas analíticas com base em uma derivatização química específica de grupos carbonil com hidrazinas, hidrazidas e hidroxilaminas que podem ser detectados espectrofotometricamente, usando o kit ELISA ou Método de Western blot. Outros métodos analíticos, como cromatografia, espectrometria de massa e espectroscopia de fluorescência também pode ser aplicado para realizar a quantificação de moléculas carboniladas. Para o método espectrofotométrico de quantificação de proteínas carboniladas, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é geralmente usado como um reagente de derivatização (CROPOTOVA; RUSTAD, 2019).

Diversas revisões e monografias úteis resumiram as propriedades espectrais das proteínas (ENGELBORGHS, 2005). As proteínas contêm três resíduos de aminoácidos que contribuem para sua fluorescência ultravioleta, que geralmente são descritos por suas abreviações de três ou uma letra. Estes são tirosina (tyr, Y), triptofano (trp, W) e fenilalanina (phe, F) (LAKOWICZ, 2006).

A análise da fluorescência da proteína dependente do tempo é dificultada pelo fato de que o decaimento da fluorescência de um único resíduo de triptofano geralmente já é multiexponencial, enquanto muitas proteínas contêm mais de um triptofano (ENGELBORGHS, 2005).

A espectroscopia de fluorescência é um método apropriado para determinar a interação entre um ligante de pequena molécula e uma bio-macromolécula. A partir de medições e análises de pico de emissão, eficiência de transferência de energia,

tempo de vida, polarização de fluorescência etc., uma vasta quantidade de informações será obtida sobre as flutuações estruturais e o microambiente do fluoróforo em macromoléculas (CHEN et al., 2006).

Os dados espectrais de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão. Um espectro de emissão de fluorescência é um gráfico da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda (nanômetros) ou número de onda (cm^{-1}). Os espectros de emissão variam amplamente e dependem da estrutura química do fluoróforo e do solvente no qual está dissolvido. Os espectros de alguns compostos, como o perileno, mostram uma estrutura significativa devido aos níveis individuais de energia vibracional do solo e dos estados excitados. Outros compostos, como quinino, mostram espectros desprovidos de estrutura vibracional (LAKOWICZ, 2006).

2.11 Fluorimetria de lactoferrina

Vários estudos de fluorescência de proteína vem sendo realizados com lactoferrina, como o estudo de Fan et al. (2006), que investigou a ligação do mesilato de pefloxacina (PFLX) à lactoferrina bovina (BLf) e albumina sérica humana (HSA) em solução aquosa diluída usando espectros de fluorescência e espectros de absorvância. Bem como, Chen et al., (2006) investigou a reação de ligação entre lomefloxacina e BLf, os parâmetros de ligação e eficiência de transferência de energia foram medidos e verificou o efeito da lomefloxacina nas alterações conformacionais do BLf.

A reação com a ligação da tosufloxacina ao BLF foi estudada, e os parâmetros de ligação, bem como a eficiência de transferência de energia, também foram medidos com base no modelo de ligação ao local. O procedimento de desdobramento do BLF induzido pela tosufloxacina foi investigado usando o diagrama de fase de fluorescência (GUO et al., 2011). A interação entre lactoferrina bovina (bLf) e cloridrato de tetraciclina (TCH) foi pesquisada por termoforese em microescala (MST), métodos multiespectroscópicos e técnicas de docking molecular. Os resultados de fluorescência normal mostraram que o TCH extinguiu eficazmente a fluorescência intrínseca de bLf por meio de extinção estática (SUN et al., 2018).

A interação molecular entre bLf e EGCG foi estudada e observou-se que EGCG tornou a estrutura bLf mais compacta, fazendo alterações na estrutura terciária. no entanto, não há pesquisas estudando os efeitos da tetraciclina nas alterações estruturais e conformacionais de bLf (SUN et al., 2018).

(HUANG et al., 2018) investigou a implicação biológica da interação entre o fibrinogênio e o resveratrol e observaram que o fibrinogênio fortaleceu a estabilidade do resveratrol. Este mesmo estudo, investigou as interações entre 3 compostos flavonóides e amilase, e os resultados mostraram que os 3 compostos flavonóides são inibidores eficazes da amilase.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Empregar distintas técnicas de purificação de lactoferrina-Lf presente no leite de bubalinos, monitorando a purificação por técnicas fluorimétricas e espectrofotometria.

3.2 Objetivos específicos:

Purificar lactoferrina de búfala por cromatografia líquida acoplada FPLC.

Monitorar a purificação e caracterização de lactoferrina por técnicas de fluorimetria.

Monitorar a purificação e caracterização de lactoferrina por técnicas de espectrofotometria.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do leite

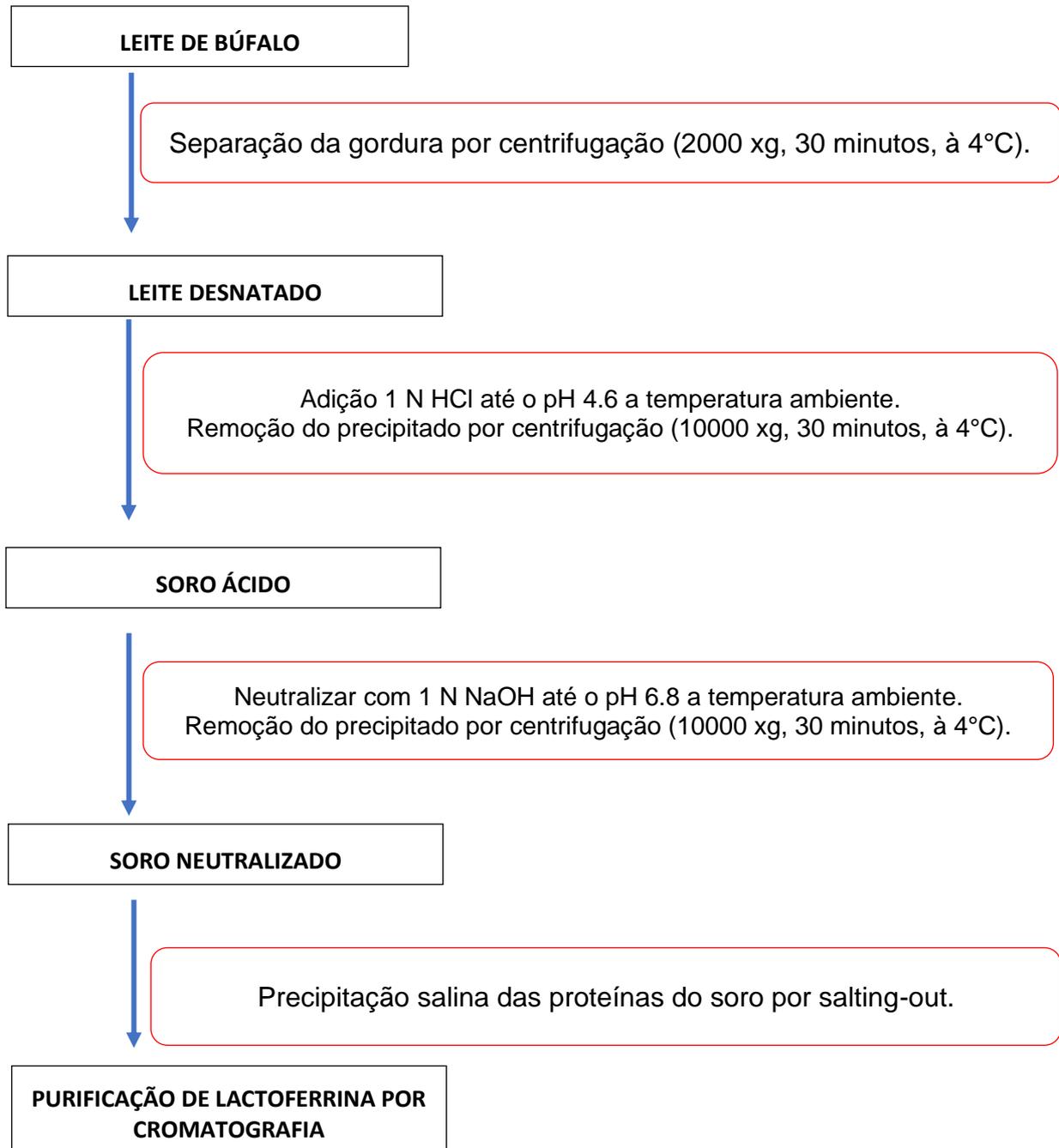
O leite foi obtido de bubalinas mestiças com predominância da raça Murrah da Fazenda Leiteira Castanha Grande da Empresa Búfalo Bú no município São Luiz do Quitunde – AL.

Após a coleta, o leite de búfalo foi armazenado e acondicionado a 4°C até ser congelado no freezer para o posterior processamento.

O processamento do leite de búfalo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia – LBE da Universidade Federal de Alagoas – Campus A.C. Simões.

4.2 Processamento do leite

O processamento do leite de bubalino iniciou-se com a remoção da gordura por centrifugação (2.000 x g, 30 minutos, 4°C). O leite desnatado obtido na etapa de remoção da gordura foi acidificado até o pH 4,6 (pI da caseína) com HCl 1 N a 25°C e a remoção do precipitado (caseína) ocorreu por centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C) obtendo o soro ácido como sobrenadante e a caseína como precipitado. Nessa etapa do processamento o soro ácido é neutralizado a pH 6,8 com NaOH 1 N a 25°C e destinado para a etapa de precipitação salina por salting out. **(Figura 2)**.

Figura 2. Fluxograma do protocolo processamento.

Fonte: Autor, (2021).

4.3 Protocolo de purificação por cromatografia

O soro ácido foi neutralizado a pH 6.8 com NaOH 1N e a remoção do precipitado ocorreu por centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C).

4.3.1 Precipitação salina (*salting-out*)

Após a obtenção do sobrenadante neutralizado mediu-se o volume da amostra para adição de sulfato de amônio de acordo com a **Tabela 5**.

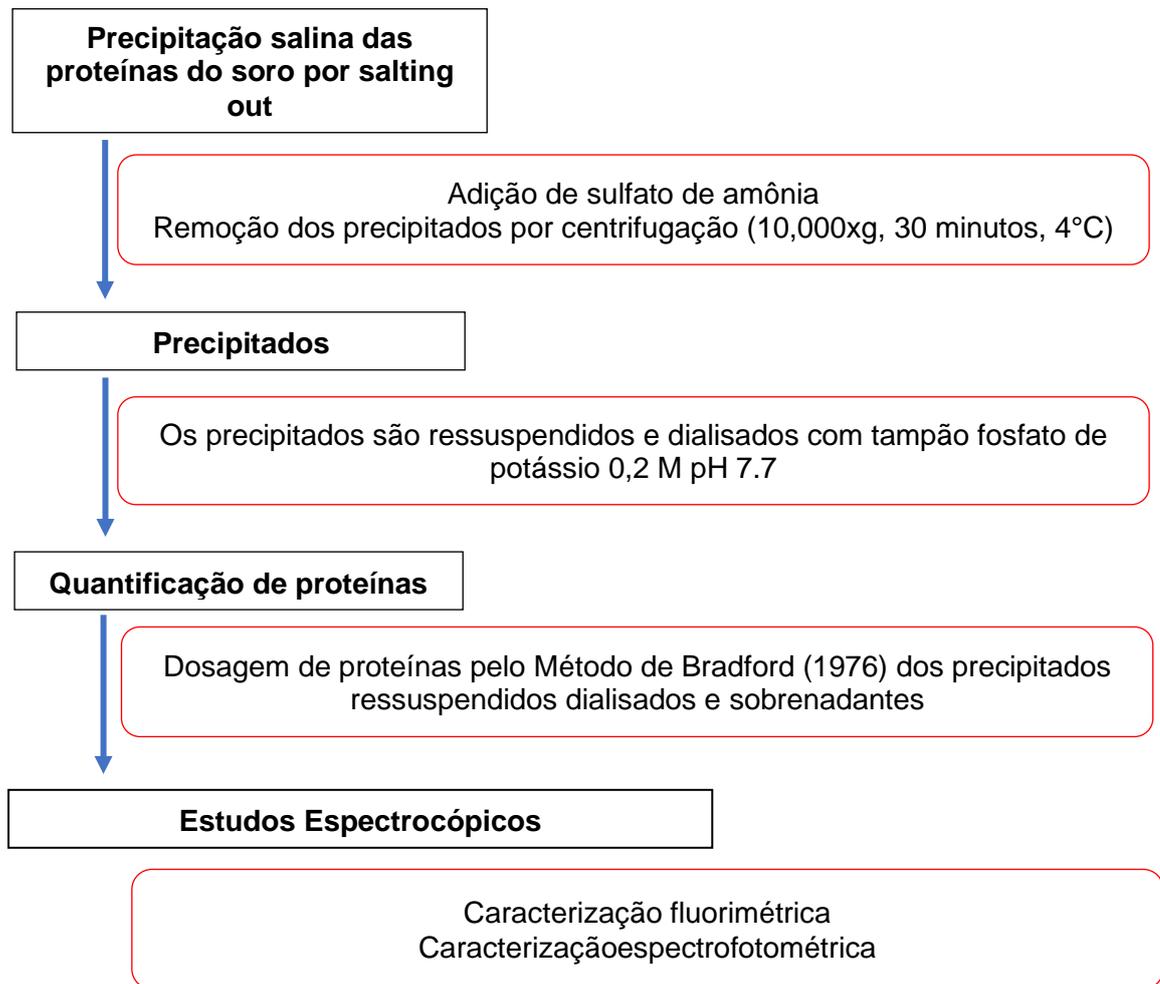
Tabela 5. Quantidade de sulfato de sódio para a precipitação salina.

| Initial concentration of ammonium sulfate | Percentage saturation at 0° | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 |
| | Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 106 | 134 | 164 | 194 | 226 | 258 | 291 | 326 | 361 | 398 | 436 | 476 | 516 | 559 | 603 | 650 | 697 |
| 5 | 79 | 108 | 137 | 166 | 197 | 229 | 262 | 296 | 331 | 368 | 405 | 444 | 484 | 526 | 570 | 615 | 662 |
| 10 | 53 | 81 | 109 | 139 | 169 | 200 | 233 | 266 | 301 | 337 | 374 | 412 | 452 | 493 | 536 | 581 | 627 |
| 15 | 26 | 54 | 82 | 111 | 141 | 172 | 204 | 237 | 271 | 306 | 343 | 381 | 420 | 460 | 503 | 547 | 592 |
| 20 | 0 | 27 | 55 | 83 | 113 | 143 | 175 | 207 | 241 | 276 | 312 | 349 | 387 | 427 | 469 | 512 | 557 |
| 25 | | 0 | 27 | 56 | 84 | 115 | 146 | 179 | 211 | 245 | 280 | 317 | 355 | 395 | 436 | 478 | 522 |
| 30 | | | 0 | 28 | 56 | 86 | 117 | 148 | 181 | 214 | 249 | 285 | 323 | 362 | 402 | 445 | 488 |
| 35 | | | | 0 | 28 | 57 | 87 | 118 | 151 | 184 | 218 | 254 | 291 | 329 | 369 | 410 | 453 |
| 40 | | | | | 0 | 29 | 58 | 89 | 120 | 153 | 187 | 222 | 258 | 296 | 335 | 376 | 418 |
| 45 | | | | | | 0 | 29 | 59 | 90 | 123 | 156 | 190 | 226 | 263 | 302 | 342 | 383 |
| 50 | | | | | | | 0 | 30 | 60 | 92 | 125 | 159 | 194 | 230 | 268 | 308 | 348 |
| 55 | | | | | | | | 0 | 30 | 61 | 93 | 127 | 161 | 197 | 235 | 273 | 313 |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 31 | 62 | 95 | 129 | 164 | 201 | 239 | 279 |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 31 | 63 | 97 | 132 | 168 | 205 | 244 |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 65 | 99 | 134 | 171 | 209 |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 32 | 66 | 101 | 137 | 174 |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 33 | 67 | 103 | 139 |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 68 | 105 |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 70 |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 35 |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |

FONTE: WENG, 2007.

Foi adicionado sulfato de amônio em quantidades proporcionais para os seguintes perfis salinos de saturação (0-20%), (20-40%), (40-60%) e (60-80%). O sal foi adicionado lentamente na amostra em banho de gelo até a solubilização, seguido de agitação em banho de gelo por 3 horas. Durante 30 minutos o sobrenadante salino de cada perfil de *salting-out* foi centrifugado a 10.000 x g a temperatura a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7 e o sobrenadante foi armazenado (frações 0-20%, 20-40%,40-60% e 60-80%) foram armazenados. Os precipitados ressuspensos foram inseridos em membrana de diálise, onde foram dialisados em 2 litros de tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 7.7 em banho de gelo. O tampão foi trocado três vezes a cada 3 horas e a última troca foi mantida overnight (**Figura 3**).

Figura 3. Fluxograma do protocolo do fracionamento proteico por precipitação salina (*salting-out*).



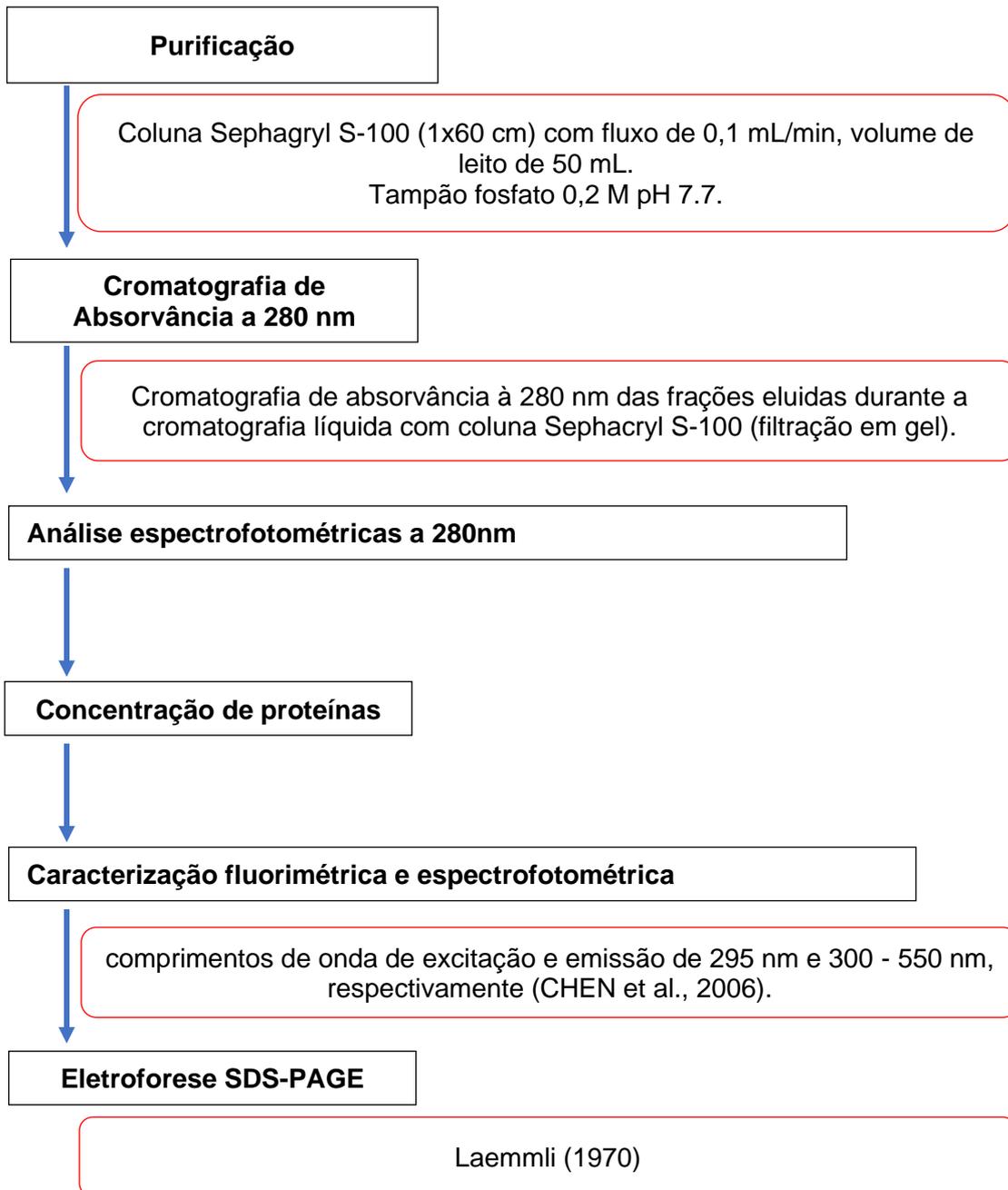
Fonte: Autor, (2021).

4.3.2 Purificação por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100)

Foi aplicada a fração de maior atividade advinda da precipitação salina em uma coluna de exclusão molecular com resina Sephacryl S-100, com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL, nas dimensões de 60x1 cm conectado a um sistema AKTA (GE). Após o equilíbrio da coluna com 1,5 volume de coluna, foi aplicado o volume de 300 uL da fração escolhida, coletando 2 mL de cada fração. Das frações foram avaliadas a presença de proteína pela absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm onde as frações dos picos de absorbância a 280 nm foram concentradas em 10.000 x g as frações emergidas em gel filtração foram submetidas a análises fluorimétricas nas condições de comprimentos de onda de excitação e

emissão de 295 nm e 300 - 550 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006). A fração com espectro de fluorescência característico da lactoferrina bubalina foi levada à eletroforese (**Figura 4**).

Figura 4. Protocolo de purificação e caracterização.



Fonte: Autor, (2021).

4.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada segundo o método de Bradford et al. (1976). No preparo do reagente de Bradford, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant, Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, a solução foi agitada durante 60 minutos, seguido de adição de 100 mL de ácido Fosfórico 85%. A solução obtida completou-se para 1 L com água deionizada e manteve-se sobre agitação durante 10 minutos. Após a filtração em papel filtro, o reagente de Bradford foi armazenado protegido da luz. A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino (1mg/mL) como padrão na faixa de construção de 5 µg/100µL à 55 µg/µ100µL. Adicionou-se 2500µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100µL de solução padrão de albumina em espectrofotômetro, utilizando 100µL água em lugar de solução padrão para referência.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Preparou-se 2 géis de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970) em condições redutoras com as seguintes concentrações 8% e 12%. Foi misturado as amostras proteicas com tampão de amostra e submersos em banho-maria a 90°C por 5 minutos para desnaturar, em seguida agitou-se com o verX. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 V. Para a detecção das bandas correspondentes as proteínas, foi usado coloração com azul de Comassie (Comassie Brillant Blue R-250) em 16 horas de agitação e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético).

4.6 Estudos espectrofotométricos

Os espectros de absorção UV-visível foram registrados em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/VIS). As concentrações de trabalho da fração salina 40-60% e da fração de lactoferrina purificada da coluna Sephagryl S-100 foi de 0,421 mg/mL e a concentração de estudo da amoxicilina (sigma) $2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm foi adicionado 2,500 µL de solução de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (0,01 mol.L⁻¹ NaCl) a pH 7.0 com adições de 100 µL de fração salina 40-60% (0,421 mg/mL), 100 µL de lactoferrina purificada (0,421 mg/mL)

e 100 μL de amoxicilina ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), respectivamente. Os espectros de absorção foram registrados de 190 à 450 nm.

4.7 Estudos fluorimétricos

Após a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, os sobrenadantes salinos e os precipitados ressuspensos dialisados foram diluídos em tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,01 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaCl}$) a pH 7.0 a fim de padronizar a concentração. Seguindo, em uma célula de quartzo de 1,0 cm, as soluções de precipitado ressuspensado dialisados e sobrenadantes padronizados foram adicionadas a 2,5 ml de tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ($0,01 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaCl}$) a pH 7.0, o intervalo da solução foi gradualmente adicionado à célula usando um microinjetor. Sob a condição do aparelho, tanto da largura da fenda de entrada quanto da saída de saída de 5 nm e velocidade de varredura de 240 nm / min, foram realizadas as análises fluorimétricas para a obtenção do espectro de extinção de fluorescência das frações salinas de *salting-out* utilizando os comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300 - 550 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006). As medidas foram realizadas em triplicata em um fluorímetro de marca Shimadzu RF 5301PC na faixa de 300 nm-550 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Processamento do leite bubalino

No processamento de 490 mL de leite bubalino, obtemos uma massa de gordura 41,806 g, um volume de leite desnatado de 440 mL, a massa de caseína de 53,104 g, o volume de soro ácido de 380 mL, 14,683 g do precipitado e o volume de soro neutralizado de 350 mL (**Tabela 6**).

Tabela 6. Balanço de massa do processamento do leite de búfalo.

| Amostra | Volume (mL) | Massa (g) |
|--------------------------|-------------|-----------|
| Leite | 490 | - |
| Gordura do leite | - | 41,806 |
| Leite desnatado | 440 | - |
| Precipitado (caseína) | - | 52,104 |
| Soro ácido | 380 | - |
| Precipitado neutralizado | - | 14,683 |
| Soro neutralizado | 350 | - |

Fonte: Autor, (2021).

5.2 Fracionamento da lactoferrina bubalina

Nesta etapa o soro neutralizado bubalino submetido a precipitação salina com sulfato de amônio com os perfis de saturação de (0-20%), (20-40%), (40-60%) e (60-80%). O método adotado aumenta a eficiência da cromatografia líquida, melhorando o fator de purificação da proteína, pois é um método de solubilidade simples, de baixo custo e não acarreta a perda estrutural e da atividade da proteína. Nesta etapa fez-se necessário o controle do tempo e temperatura para todos os fracionamentos do processo. A **Tabela 7** mostra a concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de *salting-out* de (0-20%), (20-40%), (40-60%) e (60-80%). Este método foi monitorado por estudos fluorimétricos de acordo com Chen et al., (2006).

É possível observar na **Tabela 7**, que as amostras do sobrenadante 60-80% e do precipitado ressuspendido 60-80% teve suas concentrações de proteínas elevas 182,8 mg/L e 26,40 mg/mL, respectivamente. Este valor elevado da concentração de

proteínas é devido a presença de sulfato de amônio nas amostras, por mais que, as amostras foram submetidas ao processo de diálise o método de Bradford para dosagem de proteínas é muito sensível. Deste modo, o método de Bradford obtém valores alterados devido a presença de sais nas amostras.

O trabalho realizado Melo et al. (2018) ainda não publicado, mostra o estudo fluorimétrico para obter o espectro de extinção de fluorescência da Lactoferrina Bovina (0,842 mg/mL) e da Lactoferrina Comercial (Sigma) (0,842 mg/mL) utilizando as condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300-550 nm relatada por Chen et al., (2006).

Tabela 7. Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de precipitação salina (*salting-out*).

| Amostra | Volume (mL) | Concentração de proteínas (mg/mL) | Proteína total (g) |
|--|--------------------|--|---------------------------|
| Sobrenadante 0-20% | 330 | 3,438 | 1,134 |
| Sobrenadante 20-40% | 310 | 3,221 | 0,998 |
| Precipitado ressuscendido 20-40%* | 3,75 | 0,8262 | 0,003 |
| Sobrenadante 40-60% | 280 | 1,713 | 0,479 |
| Precipitado ressuscendido 40-60%** | 2,92 | 4,542 | 0,013 |
| Sobrenadante 60-80% | 260 | 182,8 | 47,52 |
| Precipitado ressuscendido 60-80%*** | 11,08 | 26,40 | 0,292 |

Fonte: Autor, (2021).

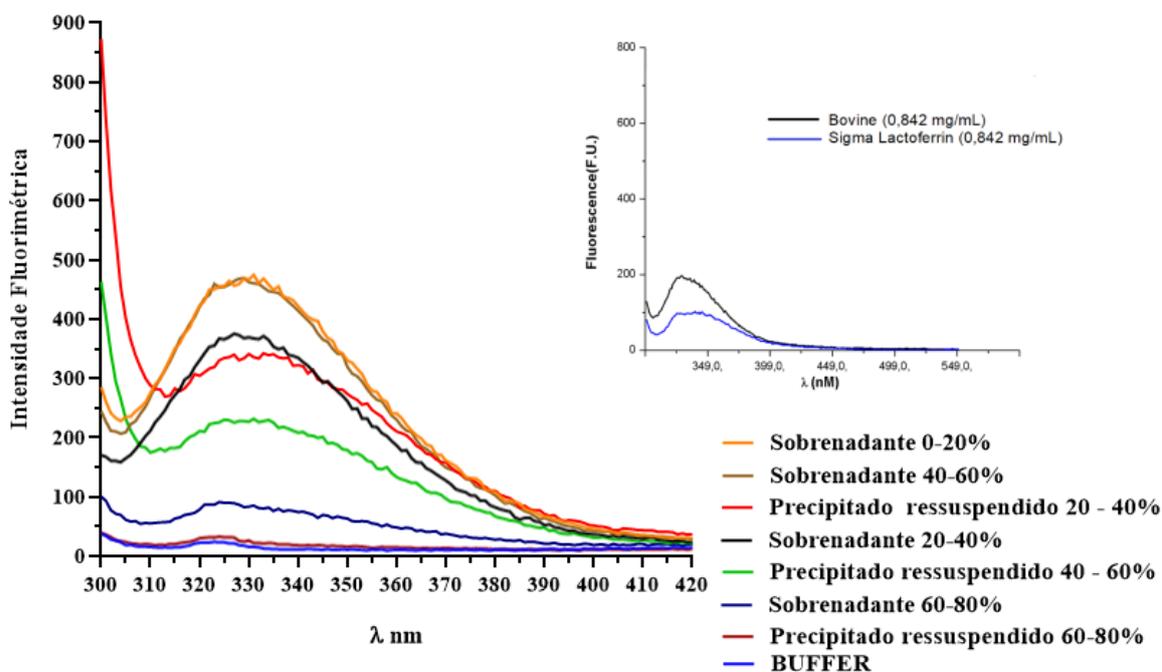
* 500 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7.

** 300 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7.

*** 1000 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7

Baseando-se nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300-550 nm relatada por Chen et al., (2006) em que estudou a reação de ligação entre lomefloxacin e BLf e no estudo realizado por Melo et al. (2018) em a bovino lactoferrina pura (SIGMA) apresenta um espectro de fluorescência característico da lactoferrina na intensidade fluorimétrica e um pico de emissão extinção de fluorescência em 332 nm. É possível observar que a **Figura 5** mostra que os espectros de fluorescência das frações salinas dos precipitados ressuspensos (20-40%) e (40-60%) obtiveram o espectro de extinção de fluorescência característico de lactoferrina bovina pura (sigma) com de intensidade fluorimétrica de aproximadamente 332 nm nas condições de comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300-550 nm, respectivamente. Resultado semelhante foi observado em um estudo similar realizado por Chen et al., (2006) em que detectou o espectro de fluorescência da lactoferrina na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm.

Figura 5. Espectro de fluorescência de lactoferrina bubalina das frações salinas dos perfis de precipitação salina (*salting-out*) (pH 7, 290 nm).



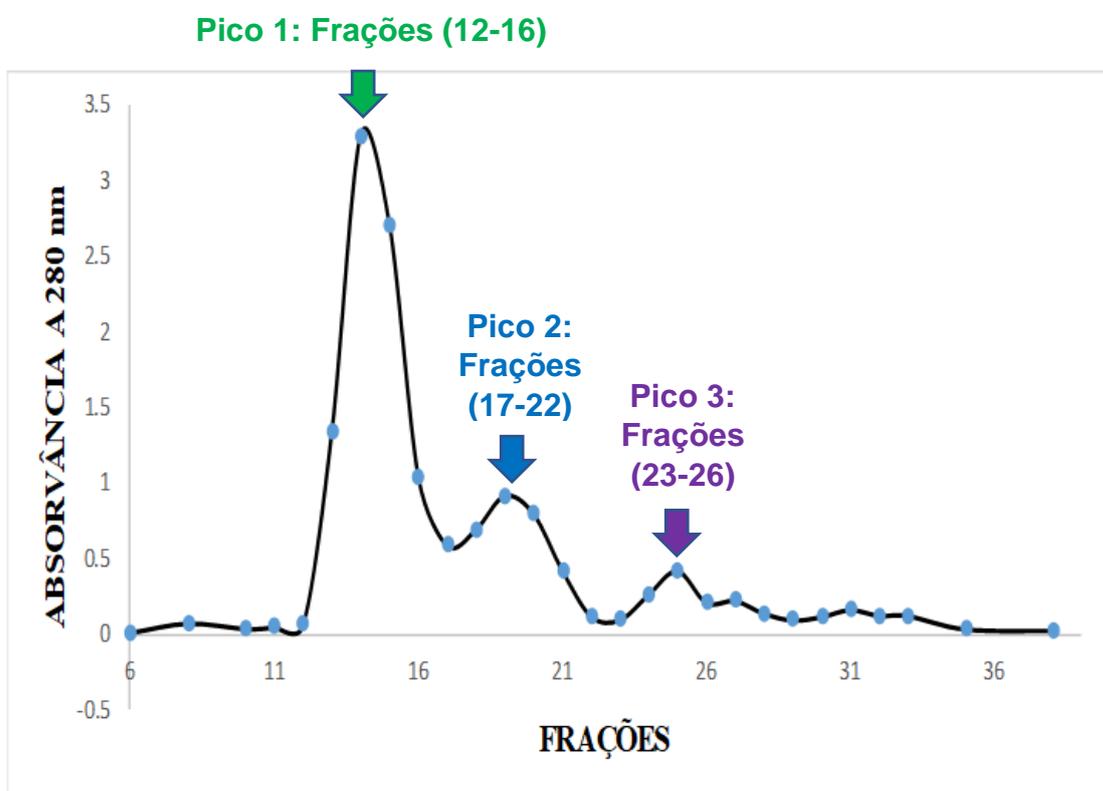
Fonte: Autor, (2021).

O precipitado ressuspendido (40-60%) (4,5442 mg/mL) foi destinado a etapa de purificação devido a concentração de proteínas ser maior em relação ao precipitado ressuspendido (20-40%) (0,8262 mg/mL).

5.3 Purificação por cromatografia líquida (Sephacryl S-100)

Foi aplicado 300 μ L do precipitado ressuspendido (40-60%) na coluna cromatográfica Sephacryl S-100 de gel filtração. Foram coletadas alíquotas de 2 mL que teve estimada a presença de proteínas por Cromatográfica de absorvância à 280 nm. A **Figura 6** apresenta um perfil cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspendido 40 – 60% (300 μ L) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.

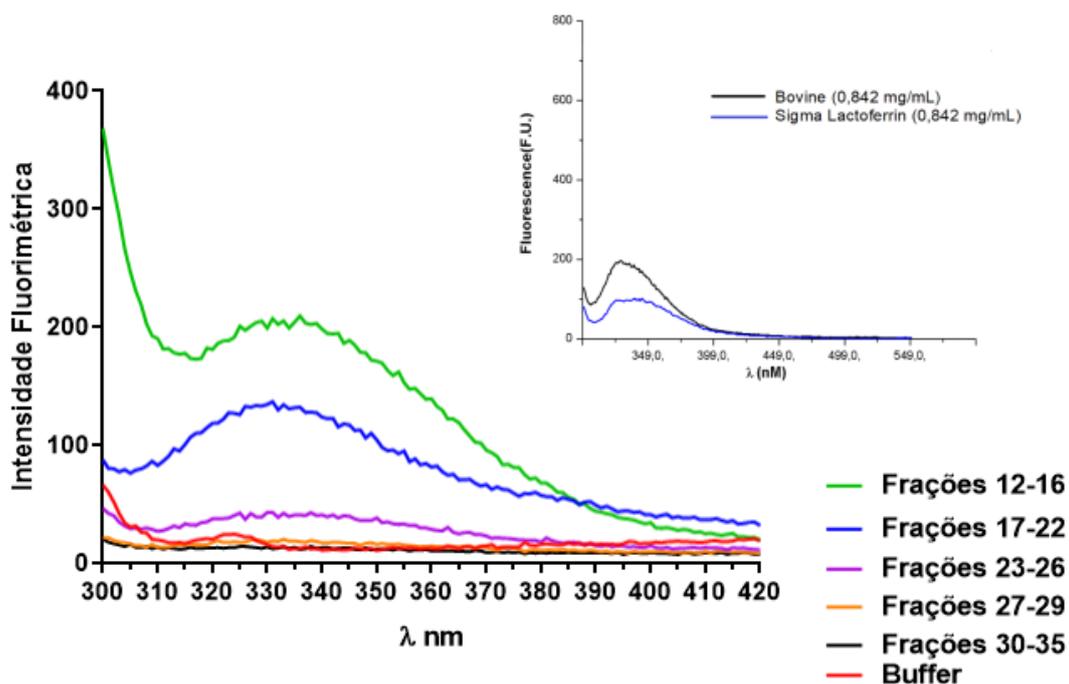
Figura 6. Perfil Cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspendido 40 – 60% (300 μ L) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.



Fonte: Autor, (2021).

É possível observar que o perfil cromatográfico da absorvância a 280 nm de eluição do precipitado ressuspenso (40-60%) (300 μ L) durante a eluição da cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100 apresenta três picos de estimativa de proteínas, sendo o pico 1 as frações dos tubos 12 à 16, o pico 2 as frações dos tubos 17 à 22 e o pico 3 as frações dos tubos 23 à 26. As frações que compõem os picos 1 (12-16), 2 (17-22) e 3 (23-26) foram reunidos, e submetidos a estudo fluorimétricos nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 290 nm e 300-500 nm, respectivamente (**Figura 7**) (CHEN et al., 2006).

Figura 7. Espectros de fluorescência da eluição das frações eluidas e reunidas do pico 1 (frações 12-16), pico 2 (frações 17-22) e pico 3 (frações 23-26) em cromatografia filtração em gel Sephacryl S – 100 (pH, 7; 290nm).



Fonte: Autor, (2021).

É possível observar que as frações reunidas 12 a 16 referentes ao pico 1, apresentou o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina comercial (Sigma, USA) com intensidade fluorimétrica de aproximadamente 332 nm baseado no trabalho de Chen et al., (2006), detectou o espectro de

fluorescência da lactoferrina na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm. Em um trabalho similar Sun et al., (2018) obteve o espectro de fluorescência da lactoferrina bovina com intensidade fluorimétrica de aproximadamente 333,6 nm.

As frações reunidas dos 3 picos foram concentradas com concentradores proteicos (marca) por centrifugação (15000 r.p.m., 10 minutos, 4°C). Logo após, as frações reunidas foram submetidas e quantificação de proteínas pelo método de Bradford e aos estudos fluorimétricos nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 290 nm e 300-500 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006). A **Tabela 8** mostra as concentrações de proteínas das frações reunidas e concentradas dos 3 picos, onde a fração reunida 12 a 16 do pico 1 a concentração de 0,9293 mg/mL.

Tabela 8. Teor de proteínas dos picos após passar em concentradores de proteínas.

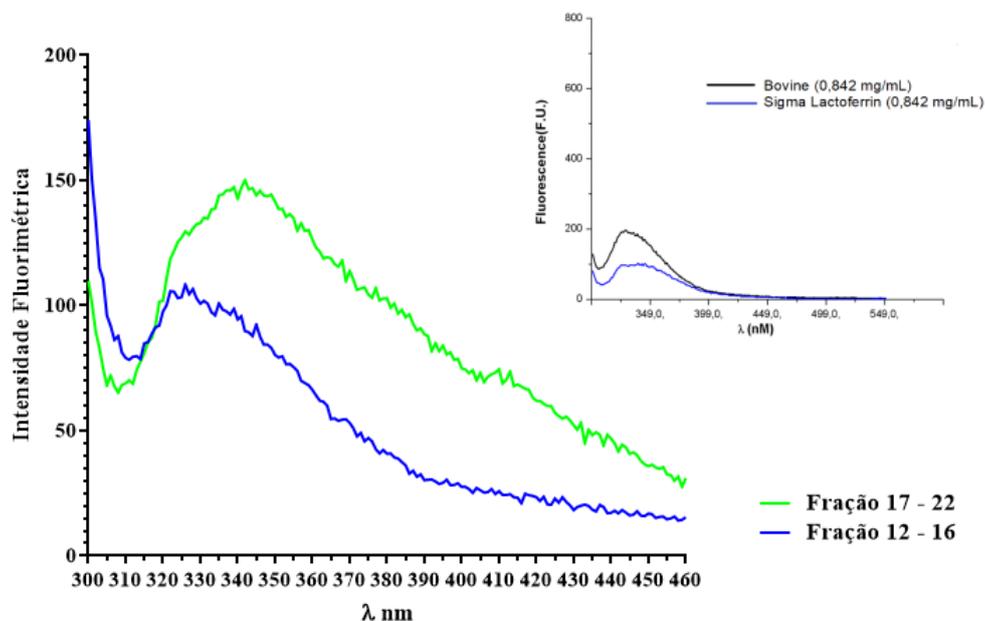
| Amostra | Volume (mL) | Concentração de proteína (mg/mL) | Proteína total (g) |
|---------------------------|-------------|----------------------------------|--------------------|
| Pico 1: Frações (12 a 16) | 6 | 0,9293 | 0,006 |
| Pico 2: Frações (17 a 22) | 7 | 0,1945 | 0,001 |
| Pico 3: Frações (23 a 26) | 8 | - | - |

Fonte: Autor, (2021).

Observou-se na **Figura 8**, o Espectros de fluorescência dos picos 1 e 2 após passar no concentrador de proteínas. As frações reunidas 12 a 16 referentes ao pico de eluição apresentou o espectro de extinção de fluorescência semelhante ao da lactoferrina com uma intensidade fluorimétrica de 350 nm. O mesmo resultado foi observado por Chen et al., (2006) detectou o espectro de fluorescência da lactoferrina na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm. Em um estudo realizado por Huang et al., (2018), obteve o espectro de fluorescência de lactoferrina deslocado com intensidade fluorimétrica na região aproximadamente 349 nm. O deslocamento é devido a criação de um

ambiente mais hidrofóbico, e com o aumento da polaridade do microambiente ocorre o deslocamento da intensidade fluorimétrica.

Figura 8. Espectros de fluorescência dos picos 1 e 2 após passar no concentrador de proteínas.



Fonte: Autor, (2021).

5.4 Eletroforese

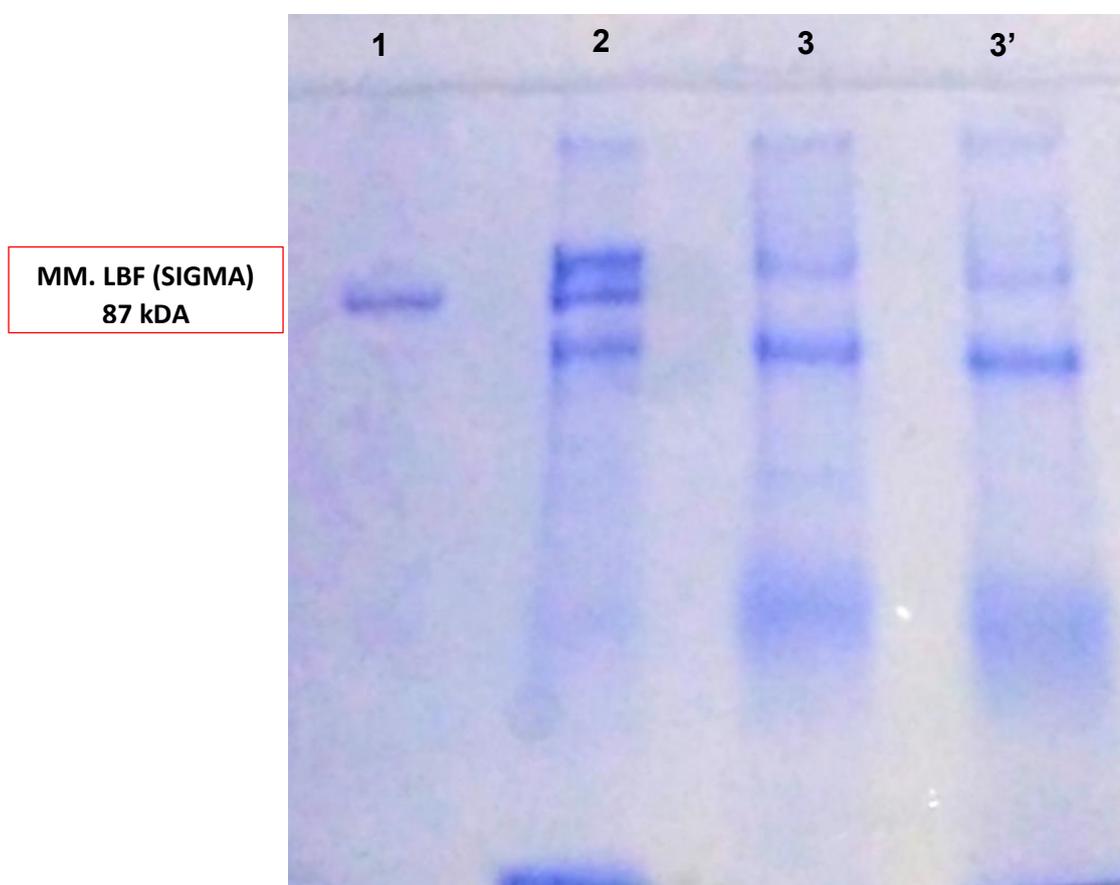
Realizou-se o estudo de varredura dos eletroforese em gel de poliacrilamida de 8% e 12% em condições redutoras. A amostra referente ao pico 1 (frações reunidas 12 a 16) (LfB) foram aplicadas no gel de eletroforeses com as concentrações no poço de 16,80 μg (1) da Lactoferrina comercial da SIGMA - (LfS) (87 KDa) e essa amostra foi considerada como padrão de peso molecular. Também foram aplicadas nas concentrações no poço de 13,42 μg (3) e 15,10 μg (3') no poço da lactoferrina parcialmente purificada e o Sobrenadante Neutralizado – (WfB) na concentração no poço de 6,06 μg (2). Os géis de eletroforeses SDS-PAGE posteriormente foram corados por solução de 8% de *Comassie Blue* e depois descorada, que resultou nos géis na **Figura 9**.

É possível observar que o gel de eletroforese SDS-PAGE à 8% obteve uma melhor resolução carga/massa das bandas marcadas pelo corante, que

mostra a presença de duas bandas de proteínas na fração LfB. A fração LfS obteve uma banda de proteína no gel SDS-PAGE à 8%. Bem coo, é possível observar no SDS-PAGE a 8% que a Lactoferrina bubalina tem o peso molecular superior a 87 kDa quando comparado com a lactoferrina bovina pura (SIGMA) que possui um peso molecular de 87 KDa.

Quanto ao fato da lactoferrina bubalina apresentar um padrão de bandas de proteínas com massa aproximada de 80 kDa, outras lactoferrinas apresentam massas muito próximas e padrões de eletroforese encontrado nesse trabalho. Kim et al., (2009) isolou de equinos da Mongólia a lactoferrina de 82 KDa, bem como Yugis et al., (2015) isolou de cabra a lactoferrina de 82 KDa, Carvalho et al., (2014) isolou do soro de queijos a lactoferrina de 80 KDa.

Figura 9. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas por Sephacryl S-100:(a) gel SDS – PAGE de concentração 8%: (LfS: lactoferrina comercial Sigma (16,80µg), WfB: Sobrenadante Neutralizado (6,06µg) e LfB: lactoferrina bubalina purificada (13,42 µg; (15,10µg)).



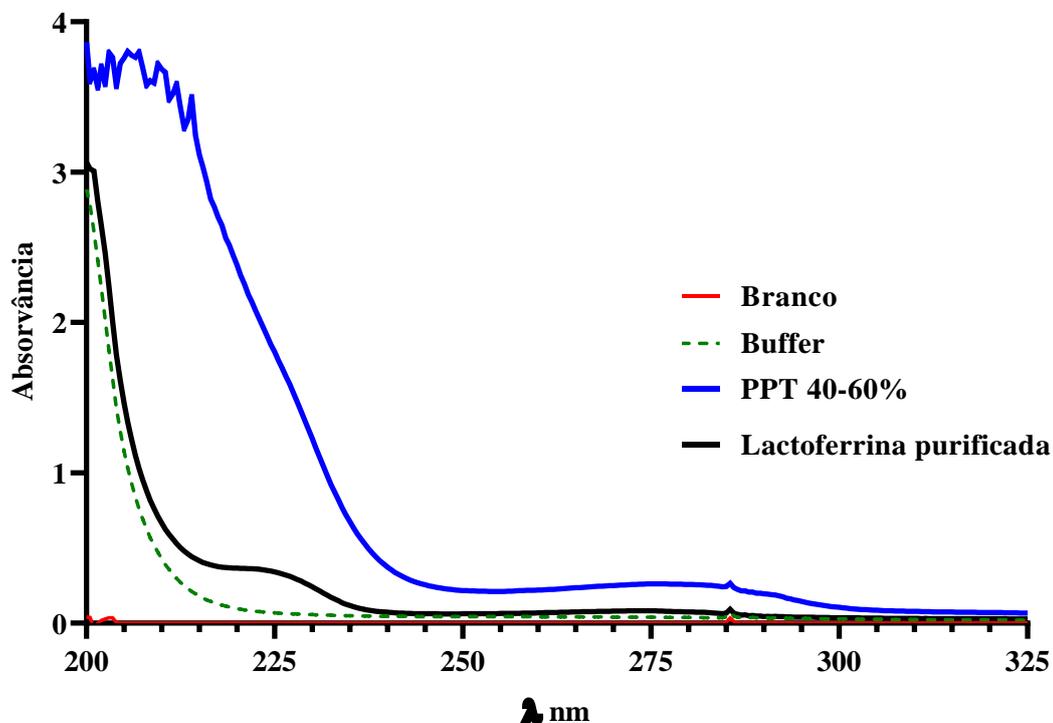
1 (LfS: lactoferrina comercial Sigma (16, 80µg)), 2 (WfB: Soro neutro (5,10 µg)), 3 (LfB: lactoferrina bubalina purificada (13,42 µg) e 3' (LfB: lactoferrina bubalina purificada (15,10µg)).

5.5 Caracterização espectrofotométrica

A caracterização espectrofotométrica foi utilizada para monitorar o processo de fracionamento salino, purificação e caracterização do precipitado ressuspendido dialisado 40-60% e da fração parcial purificada de lactoferrina, assim como, a caracterização espectrofotométrica permitiu avaliar a interação da lactoferrina parcialmente purificada pela Sephacryl S-100 com o antibiótico amoxicilina, em que é possível explorar as mudanças estruturais da Lactoferrina bubalina com a amoxicilina.

Na **Figura 10** é possível observa que a amostra de lactoferrina parcialmente purificada emergida pela por cromatografia Sephacryl S-100 obteve um pico no espectro UV-vis de Absorvância na região de 225 nm semelhante com o espectro UV-vis de Lactoferrina de bovina obtido em um estudo realizado por Morin, (2013). É possível observar que o precipitado ressuspendido dialisado 40-60% na faixa de emissão de 200 à 500 nm obteve o espectro UV-visível de absorvância diferente da fração eluida da cromatografia líquida Sephacryl S-100 de lactoferrina parcialmente purificada, quando comparados. Essa diferença de espectro UV-vis de absorção é caracterizada a presença de outras proteínas do soro no perfil salino do precipitado ressuspendido dialisado 40-60%. Dessa forma, após purificação obteve uma fração mais purificada de lactoferrina bubalina com espectro UV-vis de absorvância semelhante aos do trabalho realizado por Morin, (2013).

Figura 10. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina purificada (0,421 mg/mL), do precipitado ressuspendido dialisado 40-60% na concentração de 0,421 mg/mL.



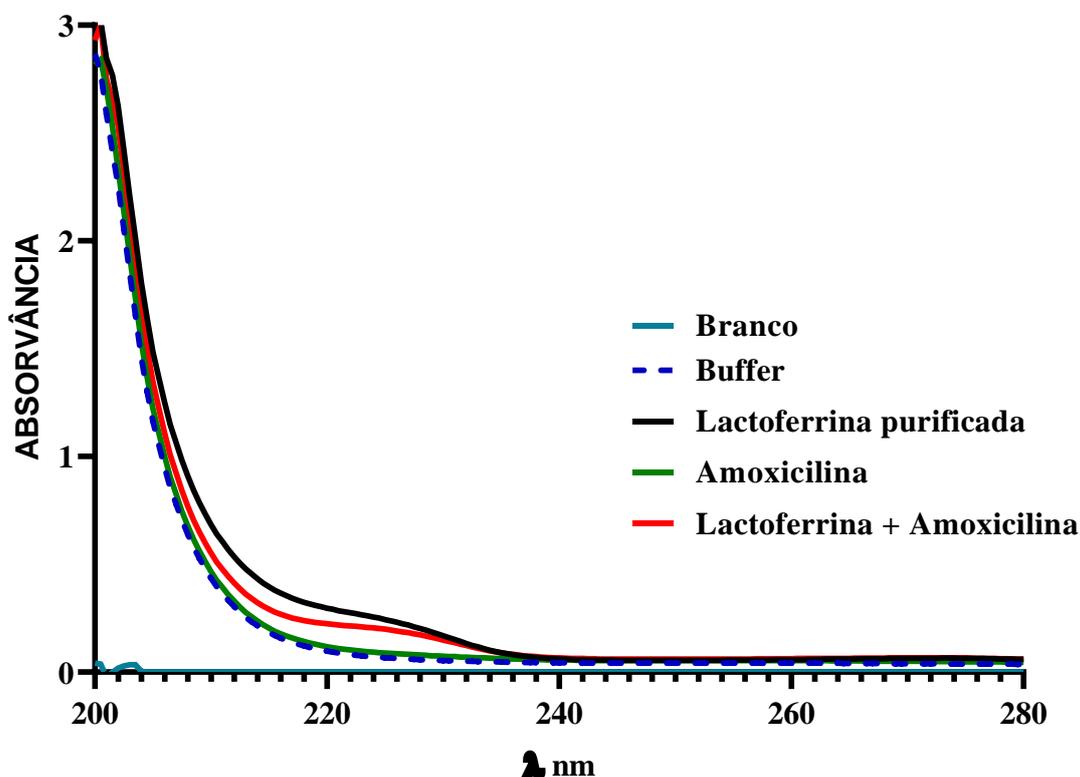
Fonte: Autor, (2021).

Estudos sobre o mecanismo de reação entre proteínas e drogas usando técnicas espectrais em combinação com modelagem molecular são uma abordagem comum para estudar a ligação em detalhes. As diferenças na interação de drogas isoméricas com BLF são estabelecidas usando dados espectrais experimentais e análises teóricas. O objetivo é elucidar o mecanismo de eficácia e toxicidade do medicamento, metabolismo, farmacocinética e força de ligação do medicamento-lactoferrina, entre outras possibilidades (GUO et al., 2017).

Nesse contexto é possível observar na **Figura 11**, que os espectros UV-vis de lactoferrina parcialmente purificada (0,421 mg/mL), amoxicilina ($2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹) e a mistura da amoxicilina mais lactoferrina parcialmente purificada tem o espectro UV-visível de absorção semelhantes. O espectro UV-vis de lactoferrina parcialmente purificada um espectro máximo de absorção em 190nm

a 550 nm (linha preta), o mesmo espectro UV-vis foi observado para a amoxicilina acoplada com a lactoferrina parcialmente purificada (Fração 12-16) (linha vermelha). O espectro UV-visível de absorção da Amoxicilina $2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ obteve um espectro UV-visível idêntico com o espectro de UV-visível do tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (0,01 mol.L⁻¹ NaCl). Diante desse resultado, resíduos do antibiótico amoxicilina no leite podem afetar a interação entre lactoferrina e íons de ferro, que podem afetar as funções da lactoferrina.

Figura 11. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina purificada (0,421 mg/mL), amoxicilina ($2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹) e a lactoferrina acoplada com a lactoferrina..



Fonte; Autor, (2021).

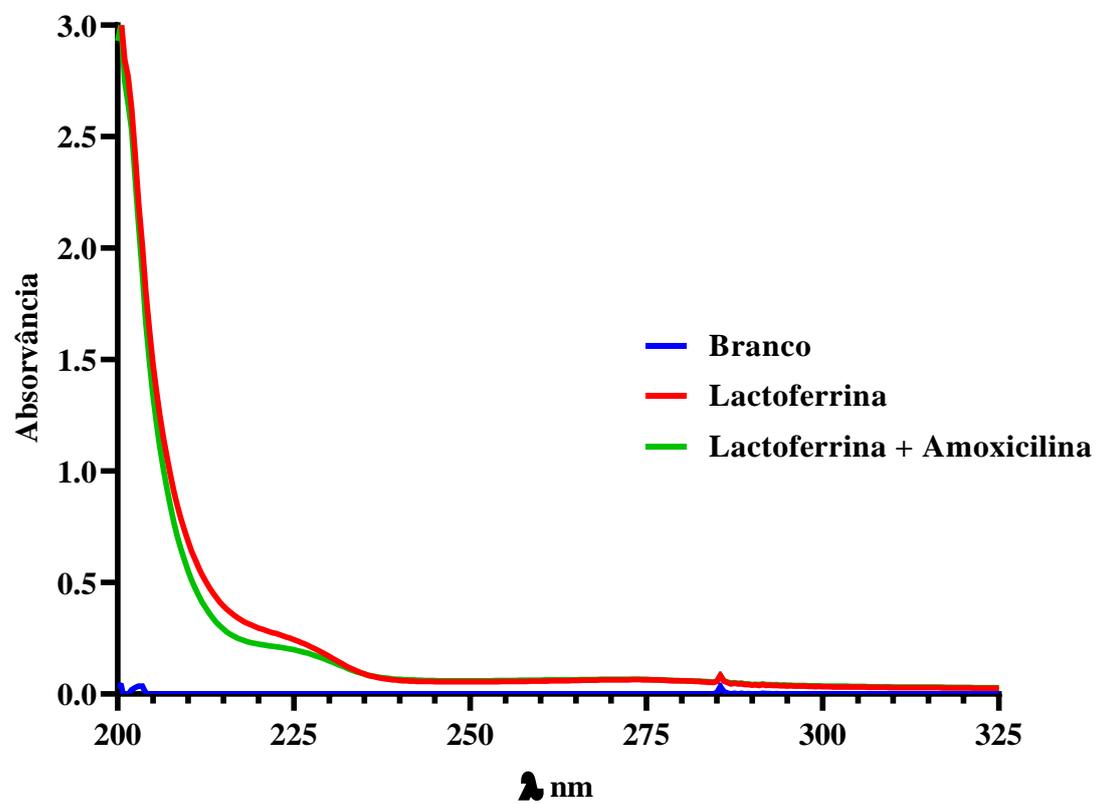
Na **Figura 12** é possível observar que a lactoferrina purificada exibiu um espectro UV-visível de absorção máximo na região de 225 nm. Mas a Lactoferrina purificada acoplada com a amoxicilina exibiu uma diminuição e um

desvio em seu espectro de UV-visível de absorção em 225 nm quando comparado com o espectro UV-visível da lactoferrina purificada. Este resultado é plausível pois, os resíduos do antibiótico amoxicilina no leite podem afetar a interação entre lactoferrina e íons de ferro, que podem afetar as funções da lactoferrina. Além disso, a interação da lactoferrina bubalina com os resíduos de antibióticos amoxicilina podem levar a mudanças na estrutura da lactoferrina bubalina.

Diferentemente, Huang et al. (2018), com o objetivo de estudar a interação com flavonoides com a lactoferrina bovina, de modo que, um composto bioativo com atividades antibacteriana e antioxidante, as micromoléculas de flavonóides podem possivelmente ter um impacto na atividade do BLF em reações inflamatórias. Demonstrou que pode haver influência dos flavonoides no espectro UV-visível de BLf, em quem a lactoferrina bovina BLF sem adição exibida um pico máximo de absorção em 280nm, mas BLF mostrou um desvio no azul de 280 nm a 268 nm ou de 280 nm a 270 nm com a adição de Luteolina (LTL) ou Quercetina (QCT), respectivamente, e um desvio para o vermelho de 280 nm para 283 nm com a adição de Naringenina (NGN). Além disso, com a adição dos flavonoides resultou na presença de um novo pico em 370 nm, que é o pico característico dos flavonoides, e os valores de absorção dos flavonoides aumentaram com o aumento da concentração de flavonoides, o que confirmou ainda mais a ocorrência de interações entre três flavonoides e lactoferrina bovina.

Sun et al. (2018), avaliou com espectros de absorção de UV-visível que foram medidos para explorar a mudança estrutural de bLf com a adição de hidrocloreto de tetraciclina (TCH). Este estudo observou que a intensidade de absorção de bLf aumentou e um novo pico de absorção apareceu a 360 nm com adição gradual de TCH à solução de bLf. Especulamos que os novos picos de absorção são o pico das estruturas recém-geradas. Pois resíduos do antibiótico THC no leite podem afetar a interação entre lactoferrina e íons de ferro, que podem afetar as funções da lactoferrina bovina.

Figura 12. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina purificada (0,421 mg/mL) e a lactoferrina acoplada com a amoxicilina.



Fonte: Autor, (2021).

CONCLUSÃO

De acordo com os estudos realizados foi possível monitorar a precipitação salina do soro neutralizado, o isolamento e a purificação da lactoferrina bubalina em cromatografia líquida de gel filtração Sephacryl S-100 por monitorado através do método fluorimétrico utilizando as condições de comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300 - 550 nm.

Através dos estudos espectrofotométricos foi possível realizar o monitoramento do isolamento e purificação da lactoferrina bubalina na faixa de espectros UV-visível de absorção registrados de 190 à 450 nm.

A SDS-PAGE revelou que a Lactoferrina bubalina presente no pico 1 (frações reunidas 12 a 16) tem massa maior que 87 kDa (massa molecular de BLF Sigma).

A resina Sephacryl S-100 não é adequada para a purificação da lactoferrina, pois a capacidade da coluna máxima é até 100 KDa, visto que, a lactoferrina bubalina possui o peso molecular maior de 87 KDa, como mostrado no SDS-PAGE, sendo assim, o máximo da capacidade da Sephacryl S-100. Contudo, para obter uma melhor purificação necessitaria da coluna Sephacryl S-200 que tem a capacidade de purificação de proteínas em até 250 KDa, ideal para a purificação da lactoferrina bubalina.

Os estudos espectrofotométricos da lactoferrina bubalina purificada acoplada com a amoxicilina, permitiram estudar a interação da proteína com o antiótico. Os estudos dos espectros UV-visível de absorção mostraram que a amoxicilina quando acoplada com a lactoferrina induz a diminuição do espectro UV-vis, quando comparado com o espectro da Lactoferrina bubalina purificada. Gerando alterações na estrutura da proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. C. DE et al. 1* , 2 , 2 , 3. p. 1840–1854, 2013.
- ALVES DE SANTANA, D. Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEIN DURANTE O TREINAMENTO DE FORÇA NA MASSA MAGRA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. p. 68–79, 2014.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.
- BAKER, H. M.; BAKER, E. N. A structural perspective on lactoferrin function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 320–328, 2012.
- BRUNI, N. et al. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.
- CHEN, X. et al. Fluorometric study on the interaction between lomefloxacin and bovine lactoferrin. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 427–430, 2006.
- CROPOTOVA, J.; RUSTAD, T. A novel fluorimetric assay for visualization and quantification of protein carbonyls in muscle foods. **Food Chemistry**, v. 297, n. February, 2019.
- ENGELBORGH, Y. Time resolved protein fluorescence. Application to multi-tryptophan proteins. **Supramolecular Structure and Function** 8, v. 57, p. 73–98, 2005.
- FAN, J. CAI et al. Binding interactions of pefloxacin mesylate with bovine lactoferrin and human serum albumin. **Journal of Zhejiang University. Science. B.**, v. 7, n. 6, p. 452–458, 2006.
- FERRARI, E. F. et al. Venenos Ofídicos. p. 1–4, [s.d.].
- FISCHBORN, S. A influência do tempo de ingestão da suplementação de Whey Protein em relação à atividade física. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 14, p. 7, 2009.
- GOPALAKRISHNA, K. P.; HAND, T. W. Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020.
- GUO, M. et al. Analysis of the spectroscopic characteristics on the binding interaction between tosufloxacin and bovine lactoferrin. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 4, p. 768–775, 2011.
- HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 251–258, 2003.
- HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Whey protein: Composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

- HASCHKE, F.; HAIDEN, N.; THAKKAR, S. K. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 17–26, 2017.
- HELD, P. B. I. Fluorimetric Quantitation of Protein using the Reactive Compound Fluorescamine. **Nature Methods| Application Notes**, v. 1, n. 22, p. 1–5, 2006.
- LAKOWICZ, J. R. **General features of protein fluorescence**. [s.l.: s.n.].
- MORIN, M. Probing the Intermolecular Interactions of Lactoferrin. n. June, 2013.
- MOSCA, F.; GIANNÌ, M. L. Human milk: composition and health benefits. **La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics**, v. 39, n. 2, p. 155, 2017.
- MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: Um estudo de base populacional. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515–3522, 2013.
- Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P. M.; O'CONNOR, B. Gel-filtration chromatography. **Methods in Molecular Biology**, v. 1485, p. 15–25, 2017.
- OLIVEIRA, D. F. DE; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do instituto de laticínios Cândido Torres**, v. 67, n. 385, p. 64–71, 2012.
- POPPI, F. A. et al. Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.
- REILAND, J. Gel Filtration. **Methods in Enzymology**, v. 22, n. C, p. 287–321, 1971.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.
- SUN, Q. et al. Assessment of Binding Interaction between Bovine Lactoferrin and Tetracycline Hydrochloride: Multi-Spectroscopic Analyses and Molecular Modeling. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 8, 2018.
- ABALMEIDA, C. C. DE et al. 1* , 2 , 2 , 3. p. 1840–1854, 2013.
- ALVES DE SANTANA, D. Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEIN DURANTE O TREINAMENTO DE FORÇA NA MASSA MAGRA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. p. 68–79, 2014.
- ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**, v. 91, n. 11, p. 629–635, 2015.
- BAKER, H. M.; BAKER, E. N. A structural perspective on lactoferrin function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 320–328, 2012.
- BRUNI, N. et al. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.
- CHEN, X. et al. Fluorometric study on the interaction between lomefloxacin and

- bovine lactoferrin. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 427–430, 2006.
- CROPOTOVA, J.; RUSTAD, T. A novel fluorimetric assay for visualization and quantification of protein carbonyls in muscle foods. **Food Chemistry**, v. 297, n. February, 2019.
- ENGELBORGHES, Y. Time resolved protein fluorescence. Application to multi-tryptophan proteins. **Supramolecular Structure and Function** 8, v. 57, p. 73–98, 2005.
- FAN, J. CAI et al. Binding interactions of pefloxacin mesylate with bovine lactoferrin and human serum albumin. **Journal of Zhejiang University. Science. B.**, v. 7, n. 6, p. 452–458, 2006.
- FERRARI, E. F. et al. Venenos Ofídicos. p. 1–4, [s.d.].
- FISCHBORN, S. A influência do tempo de ingestão da suplementação de Whey Protein em relação à atividade física. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 14, p. 7, 2009.
- GOPALAKRISHNA, K. P.; HAND, T. W. Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 2020.
- GUO, M. et al. Analysis of the spectroscopic characteristics on the binding interaction between tosufloxacin and bovine lactoferrin. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 4, p. 768–775, 2011.
- HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: Mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 251–258, 2003.
- HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Whey protein: Composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.
- HASCHKE, F.; HAIDEN, N.; THAKKAR, S. K. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 17–26, 2017.
- HELD, P. B. I. Fluorimetric Quantitation of Protein using the Reactive Compound Fluorescamine. **Nature Methods| Application Notes**, v. 1, n. 22, p. 1–5, 2006.
- LAKOWICZ, J. R. **General features of protein fluorescence**. [s.l: s.n.].
- MORIN, M. Probing the Intermolecular Interactions of Lactoferrin. n. June, 2013.
- MOSCA, F.; GIANNÌ, M. L. Human milk: composition and health benefits. **La Pediatria medica e chirurgica : Medical and surgical pediatrics**, v. 39, n. 2, p. 155, 2017.
- MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: Um estudo de base populacional. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515–3522, 2013.
- Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P. M.; O'CONNOR, B. Gel-filtration chromatography. **Methods in Molecular Biology**, v. 1485, p. 15–25, 2017.

- OLIVEIRA, D. F. DE; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do instituto de laticínios Cândido Torres**, v. 67, n. 385, p. 64–71, 2012.
- POPPI, F. A. et al. Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.
- REILAND, J. Gel Filtration. **Methods in Enzymology**, v. 22, n. C, p. 287–321, 1971.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.
- SUN, Q. et al. Assessment of Binding Interaction between Bovine Lactoferrin and Tetracycline Hydrochloride: Multi-Spectroscopic Analyses and Molecular Modeling. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 8, 2018.
- BAS, Z. H.; DOOSH, K. S.; YASEEN, N. Y. Isolation, purification and characterization of lactoferrin from goat colostrum whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 14, n. 8, p. 517–523, 2015.
- ACOSTA-ZALDÍVAR, M. et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis**, v. 21, n. 2, p. 163–173, 2016.
- AMMENDOLIA, M. G. et al. Bovine lactoferrin inhibits echovirus endocytic pathway by interacting with viral structural polypeptides. **Antiviral Research**, v. 73, n. 3, p. 151–160, 2007.
- ANDERSEN, J. H. et al. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. **Antiviral Research**, v. 51, n. 2, p. 141–149, 2001.
- BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 2531–2539, 2005.
- BAKER, E. N.; BAKER, H. M.; KIDD, R. D. Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 27–34, 2002.
- BELJAARS, L. et al. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 63, n. 3, p. 197–208, 2004.
- BELTING, M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 145–151, 2003.
- BRANEN, J.; DAVIDSON, P. M. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: The effect of EDTA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 233–237, 2000.

BROUWER, C. P. J. M.; RAHMAN, M.; WELLING, M. M. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. **Peptides**, v. 32, n. 9, p. 1953–1963, 2011.

BRUNI, N. et al. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.

BURGESS, R. R. **Chapter 20 Protein Precipitation Techniques**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463

CARTHAGENA, L. Modulation of HIV Binding to Epithelial Cells and HIV Transfer from Immature Dendritic Cells to CD4 T Lymphocytes by Human Lactoferrin and its Major Exposed LF-33 Peptide. **The Open Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 27–34, 2011.

CARVALHO, B. M. A. et al. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308–314, 2014.

CHEN, X. et al. Fluorometric study on the interaction between lomefloxacin and bovine lactoferrin. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 427–430, 2006.

DROBNI, P.; NÄSLUND, J.; EVANDER, M. Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake in vitro. **Antiviral Research**, v. 64, n. 1, p. 63–68, 2004.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. **Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 541

ELNAZ, A. et al. Expression of a Recombinant Therapeutic Protein , Lactoferrin , in PichiaPink TM : a Powerful Antimicrobial Protein. v. 8, n. 1, p. 471–478, 2016.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395–405, 2003.

FERNANDES, K. E.; CARTER, D. A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: Mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–10, 2017.

FLORES-VILLASEÑOR, H. et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 569–578, 2010.

GARCÍA-MONTOYA, I. A. et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226–236, 2012a.

GARCÍA-MONTOYA, I. A. et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226–236, 2012b.

GIANSANTI, F. et al. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2016.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009.

GUO, M. et al. Comparison of the interaction between lactoferrin and isomeric drugs. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 593–607, 2017.

HUANG, J. et al. Studies on the Interaction between Three Small Flavonoid Molecules and Bovine Lactoferrin. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

HUNTER, H. N. et al. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3387–3395, 2005.

HYDE, A. M. et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research and Development**, v. 21, n. 9, p. 1355–1370, 2017.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 19–29, 2009.

KIM, K. S. et al. **Purification and characterization of mongolian mare lactoferrin** *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2009.

KRUZEL, M. L. et al. Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. **Immunology**, v. 119, n. 2, p. 159–166, 2006.

LAHOZ, E. et al. Fungistatic activity of iron-free bovin lactoferrin against several fungal plant pathogens and antagonists. **Natural Product Research**, v. 22, n. 11, p. 955–961, 2008.

LEGRAND, D. et al. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 3, p. 282–290, 2006a.

LEGRAND, D. et al. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 3, p. 282–290, 2006b.

LEGRAND, D. et al. Lactoferrin structure and functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 606, p. 163–194, 2008.

LIZZI, A. et al. Lactoferrin Derived Peptides: Mechanisms of Action and their Perspectives as Antimicrobial and Antitumoral Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 687–695, 2009.

LONGHI, G. et al. Lactoferrin inhibits early steps of human BK polyomavirus infection. **Antiviral Research**, v. 72, n. 2, p. 145–152, 2006.

MARCHETTI, M. et al. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 405–413, 2004.

MAZURIER, J.; SPIK, G. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. **BBA - General Subjects**, v. 629, n. 2, p. 399–408, 1980.

MORADIAN, F.; SHARBAFI, R.; RAFIEI, A. Lactoferrin, Isolation, Purification and Antimicrobial Effects. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 203–206, 2014.

MORENO-EXPÓSITO, L. et al. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. **Life Sciences**, v. 195, n. November 2017, p. 61–64, 2018.

MORIN, M. Probing the Intermolecular Interactions of Lactoferrin. n. June, 2013.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: Um estudo de base populacional. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515–3522, 2013.

MURATA, M. et al. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 4891–4898, 2013.

NIBBERING, P. H. et al. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1469–1476, 2001.

OCHOA, T. J.; CLEARY, T. G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 30–34, jan. 2009.

POPPI, F. A. et al. Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.

PUDDU, P. et al. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, n. 9, p. 1055–1063, 1998.

RAEI, M. et al. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 669–673, 2015.

RAMOS-CLAMONT, G. et al. Actividad antibacteriana de lactoferrina bovina y lactoferrina porcina sobre escherichia coli k88+. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, v. 20, n. 5, p. 473–479, 2010.

REBOUILLAT, S.; ORTEGA-REQUENA, S. Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint.

Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, v. 06, n. 03, p. 176–203, 2015.

RIPOLLES, D. et al. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **International Dairy Journal**, v. 45, p. 15–22, 2015.

RODRÍGUEZ-FRANCO, D. A.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n. 3–4, p. 102–111, 2005.

SBAN. a Importância Do Consumo De Leite No Atual Cenário. **Sban, Sociedade Brasileira De Alimentacao E Nutricao**, p. 28, 2015.

SHARMA, A. et al. Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. **Food Reviews International**, v. 9129, 2019.

SHIN, K. et al. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 407–411, 1998.

SILVA, T. et al. Structural diversity and mode of action on lipid membranes of three lactoferrin candidacidal peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 5, p. 1329–1339, 2013.

SINHA, M. et al. Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. **International Journal of Peptides**, v. 2013, 2013.

STEIJNS, J. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. S1, p. 11–17, 2000.

STELLWAGEN, E. **Gel filtration**. [s.l: s.n.]. v. 182

SUN, Q. et al. Assessment of Binding Interaction between Bovine Lactoferrin and Tetracycline Hydrochloride: Multi-Spectroscopic Analyses and Molecular Modeling. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 8, 2018.

SUPERTI, F. et al. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1528, n. 2–3, p. 107–115, 2001.

TERADA, L. et al. Efeitos metabólicos da suplementação do Whey Protein em praticantes de exercícios com pesos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 16, p. 3, 2009.

TITOV, E. I. et al. Growth stimulating effect of bovine milk lactoferrin on dermal cells and probiotic bacteria. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 8, p. 540–546, 2016.

VAN DER DOES, A. M. et al. The antimicrobial peptide hLF1-11 drives monocyte-dendritic cell differentiation toward dendritic cells that promote antifungal responses and enhance Th17 polarization. **Journal of Innate Immunity**, v. 4, n. 3, p. 284–292, 2012.

VAN DER STRATE, B. W. A. et al. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, n. 3, p. 225–239, 2001.

VOGEL, H. J. et al. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 49–63, 2002.

WAARTS, B. L. et al. Antiviral activity of human lactoferrin: Inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate. **Virology**, v. 333, n. 2, p. 284–292, 2005.

WANG, J. et al. Inhibitory effect of lactoferrin against gray mould on tomato plants caused by *Botrytis cinerea* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 151–157, 2013.

WANG, X. et al. Studies on the competitive binding of cleviprex and flavonoids to plasma protein by multi-spectroscopic methods: A prediction of food-drug interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 175, n. April, p. 192–199, 2017.

WINGFIELD, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, p. A.3F.1-A.3F.8, 1998.

WONG, J. H. et al. A study of effects of peptide fragments of bovine and human lactoferrins on activities of three key HIV-1 enzymes. **Peptides**, v. 62, p. 183–188, 2014.

WU, M. BIN; XU, Y. J. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 2, p. 155–160, 2009.

YAMAUCHI, K. et al. Bovine lactoferrin: Benefits and mechanism of action against infections. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 3, p. 291–296, 2006.

YUGIS, A. R. et al. Comparison of Methods for The Purification of Goat Lactoferrin and Antiviral Activity to Human Papillomavirus. v. 3, n. 5, p. 171–175, 2015.