



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS –
PGMATERIAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MATERIAIS

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACTOFERRINA DE
BUBALINA (*Bubalus bubalis*), ASSOCIAÇÃO COM QUANTUM
DOTS E SUA DETERMINAÇÃO UTILIZANDO SENSOR A BASE
DE Au/PAMAM

MILENA BANDEIRA DE MELO

MILENA BANDEIRA DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACTOFERRINA DE
BUBALINA (*Bubalus bubalis*), ASSOCIAÇÃO COM QUANTUM
DOTS E SUA DETERMINAÇÃO UTILIZANDO SENSOR A BASE
DE Au/PAMAM**

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Materiais da
Universidade Federal de Alagoas, como
requisito para obtenção do título de doutor em
Ciências, área de concentração: Materiais
Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiane Caxico de
Abreu Galdino
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Sonia Salgueiro
Machado

MACEIÓ-AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- M528c Melo, Milena Bandeira de.
 Caracterização e purificação da lactoferrina de bubalina (*Bubalus bubalis*),
 associação com *quantum dots* e sua determinação utilizando sensor a base de
 Au/PAMAM / Milena Bandeira de Melo. – 2022.
 91 f. : il.
- Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Co-orientadora: Sonia Salgueiro Machado.
Tese (doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de
Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Materiais. Maceió, 2022.
- Bibliografia: f. 81-89.
1. Lactoferrina. 2. Pontos quânticos. 3. Cádmio-Selênio. 4. Cádmio-Enxofre. 5.
Fluorescência. 6. Poliamidoamina. I. Título.

CDU: 661.848



ATA DA 41ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS

No dia vinte e três de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, às 9 horas e 16 minutos, através de videoconferência online, foi realizada a DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de Milena Bandeira de Melo, tendo como título: "PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACTOFERRINA DE BUBALINA (*Bubalus bubalis*), ASSOCIAÇÃO COM QUANTUM DOTS E SUA DETERMINAÇÃO UTILIZANDO SENSOR A BASE DE Au/PAMAM", como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, com Área de Concentração em MATERIAIS. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino (Orientadora - PPGMateriais/UFAL), Prof. Dr. Sonia Salgueiro Machado (Coorientadora - UFAL), Prof. Dr. Edmundo Acioly (UFAL), Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos (UFAL), Prof. Dr. Acácia Maria dos Santos Melo (UFS) e Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas (IFAL). A Defesa foi encerrada às 12 horas e 40 minutos. Após o encerramento da Defesa, em reunião fechada, a Banca Examinadora, com base no Regimento Interno, decidiu por APROVAR a tese de Doutorado.

Em 23 de setembro de 2022.

Obs. (se houver):

Prof. Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(Orientadora - PPGMateriais/UFAL)

Prof. Dr. Sonia Salgueiro Machado
(Coorientadora - UFAL)

Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos
(UFAL)

Prof. Dr. Edmundo Acioly
(UFAL)

Prof. Dr. Acácia Maria dos Santos Melo
(UFS)

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)

Milena Bandeira de Melo
(Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Data: 23/09/2022 16:47:05-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br SONIA SALGUEIRO MACHADO
Data: 24/09/2022 07:46:29-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

gov.br DIOGENES MENESSES DOS SANTOS
Data: 27/09/2022 18:50:23-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE EDMUNDO ACIOLY DE SOUZA
Data: 27/09/2022 08:10:32-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br ACACIA MARIA DOS SANTOS MELO
Data: 24/09/2022 21:22:06-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS
Data: 24/09/2022 14:10:55-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br MILENA BANDEIRA DE MELO
Data: 28/09/2022 14:27:25-0300
Verifique em: <https://verificador.jf.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus.

Agradeço aos meus pais, Marcina Maria Barros e Adalberto Bandeira de Melo Neto pelo amor incondicional, pelo incentivo e formação.

A meu esposo Wallas Henrique de Luna Daniel, minha filha Melina Bandeira de Melo de Luna e meu filho Arthur Bandeira de Melo de Luna à minha família , por terem me entendido nos momentos de dificuldades, de dúvidas, de incertezas e de buscas por soluções.

As minhas orientadoras, Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu e Profa Dr^a. Sonia Salgueiro Machado, por suas orientações em todos os momentos, pelo apoio e pelo Norte para consecução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE) que contribuíram fortemente para a realização deste projeto: Dra. Claudiane Marinho, Álvaro, Me. Edson ; e aos professores Dr. Vitor Lima e Dr. José Maria.

Aos órgãos de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Materiais, aos meus professores.

.

RESUMO

A lactoferrina (Lf), uma proteína presente na composição do leite de vários animais, é uma glicoproteína monomérica de em torno de 80 kDa, com uma única cadeia polipeptídica de cerca de 690 resíduos de aminoácidos sendo um componente importante do sistema imunológico, incluindo bactérias, vírus, fungos, parasitas. e ainda apresenta atividades anti-inflamatórias e anticâncer. Sendo um aditivo importante para medicamentos, alimentos e cosméticos, como produtos de saúde e fórmulas infantis. Estudos com análises fluorimétricas de Lf bovina, o caprino, o búfalo revelam uma diferença entre as espécies. A molécula é dobrada em lobos N e C terminais homólogos, cada um compreendendo dois domínios que incluem uma ligação de ferro conservada local. São poucas as metodologias analíticas que podem ser aplicadas para determinação de Lf dentre estas estão os métodos espectrocópicos e eletroquímicos. Estes últimos, se destacam por apresentar boa sensibilidade, seletividade, estabilidade, baixo custo, capacidade de análise *in situ* e possibilidade de miniaturização. O objetivo desse trabalho é isolar, purificar, caracterizar a Lf bubalina, avaliar sua interação com *quantum dots* e determinar sua concentração utilizando sensor eletroquímico a base de Au/PAMAM. Para tal usaremos metodologias de purificação adaptadas da literatura. A Lf foi isolada no método proposto nesse trabalho e uma maior quantidade da mesma foi isolada do leite de bubalinas por Salting Out e após purificação em coluna cromatográfica de Sephacryl S-200. A interação entre lactoferrina de búfalo (bLf) e *quantum dots* CdSe-CdS (QD) foi pesquisada por espectrofluometria. O efeito do CdSe-CdS na conformação da Lf de búfalo também foi analisado no qual foi possível correlacionar a fluorescência com a concentração obtendo valores de constante de Stern - Volmer. Os resultados de fluorescência mostraram que os QDs efetivamente extinguiram a fluorescência da Lf. A influência dos QDs nas alterações funcionais da proteína foi observada através da análise das alterações da superfície do bLf e pesquisa das forças de ligação entre o bLf e os íons ferro. Esses resultados indicaram que as alterações na estrutura e função do bLf foram devidas à interação entre bLf e QDs. Lf também formou complexo com Quercetina. Com o sensor eletroquímico formado por eletrodo de Au modificado com PAMAM de 2ª geração, foi possível construir curva analítica entre a corrente de pico e concentração da Lf, com boa linearidade ($R= 0,994$) com limite de detecção $0,010 \mu\text{g/L}$ e limite de quantificação $0,03\mu\text{g/L}$, como também determinar a concentração da Lf em amostras de leite bovino, bubalino e caprino.

Palavras-chave: lactoferrina, quantum dots CdSe/CdS, fluorescência, Sensor, PAMAM

ABSTRACT

Lactoferrin (Lf), a protein present in milk, is a monomeric glycoprotein of around 80 kDa, with a single polypeptide chain of about 690 amino acid residues and is an important component of the immune system, including bacteria, viruses, fungi, parasites. and also has anti-inflammatory and anti-cancer activities. In this way it is an important additive in medicines, foods and cosmetics, such as health products and infant formulas. The amino acid sequence relationships place it in the transferrin family. Fluorometric analyzes of bovine, caprine, and buffalo Lf reveal a difference between species. The molecule is folded into homologous terminal N and C lobes, each comprising two domains that include a local conserved iron bond. There are few analytical methodologies that can be applied for the determination of lactoferrin, among these are the spectroscopic and electrochemical methods. The latter stand out for presenting good sensitivity, selectivity, stability, low cost, in situ analysis capacity and the possibility of miniaturization. The objective of this work is to isolate, purify, characterize Lf buffalo, evaluate its interaction with quantum dots and determine its concentration using an Au/PAMAM-based electrochemical sensor. For this we will use purification methodologies adapted from the literature. Lf was isolated in the method proposed in this work and a greater amount of it was isolated from buffalo milk by Salting Out and after purification in a Sephacryl S-200 chromatographic column. The interaction between buffalo lactoferrin (bLf) and CdSe-CdS quantum dots (QD) was investigated by spectrofluometry. The effect of CdSe-CdS on buffalo Lf conformation was also analyzed in which it was possible to correlate fluorescence with concentration by obtaining Stern - Volmer constant values. Fluorescence results showed that QDs effectively quenched lactoferrin fluorescence. The influence of QDs on protein functional alterations was observed through the analysis of bLf surface alterations and investigation of the binding forces between bLf and iron ions. These results indicated that the changes in the structure and function of bLf were due to the interaction between bLf and QDs. Lf also formed complex with Quercetin. With the electrochemical sensor formed by an Au electrode modified with 2nd generation PAMAM, it was possible to build an analytical curve between the peak current and the Lf concentration, with good linearity ($R= 0.994$) with a detection limit of $0.010 \mu\text{g/L}$ and a limit of $0.010 \mu\text{g/L}$. quantification $0.03\mu\text{g/L}$, as well as to determine the concentration of Lf in samples of bovine, buffalo and goat milk.

Keywords: Lactoferrin, quantum dots, fluorescence, Sensor, PAMAM

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Dímero β - LG.....	20
Figura 2. Estrutura terciária de (A: α lactalbumina), (B:BSA) e (C:Lactoferrina).....	21
Figura 3. 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.....	24
Figura 4. 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 a arginina (R121). Dois resíduos básicos atrás do local do ferro, uma arginina (R210) e uma lisina (K301) ajudam a modular a liberação de ferro	25
Figura 5. Variabilidade na abertura de domínio em apo-Lfs, observada em diferentes estruturas cristalinas. Na parte inferior, são mostradas a estrutura fechada (como no lóbulo N de apo-Lf de equino e lóbulos C de apo-Lf de equino e humano); duas estruturas parcialmente abertas (vistas para estruturas do lóbulo C da apo-Lf humana); e a estrutura totalmente aberta (vista para o lóbulo N da apo-Lf humana e ambos os lóbulos da apo-Lf do camelo). Acima à esquerda está a estrutura apo-Lf humana "um aberto, um fechado" (lóbulo N à esquerda, lóbulo C à direita), mostrada em azul-petróleo, e acima à direita está a estrutura apo-Lf de camelo "ambos os lóbulos abertos", em rosa. No meio, acima, as duas estruturas são sobrepostas na base de seus N-lobos, mostrando a grande diferença nas orientações de seus domínios C2.	28
Figura 6 (a) Estrutura geral da lactoferrina mostrando as posições dos peptídeos LF1-11 (azul), lactoferrampina (rosa) e lactoferricina (verde) no lobo N-terminal. (b) A estrutura ampliada mostrando a posição dos peptídeos em detalhes.	30
Figura 7 Estrutura do peptídeo Lf (1-11)	31
Figura 8. Estrutura do peptídeo Lactoferrampina.....	34
Figura 9. Funções biológicas da lactoferrina.....	35
Figura 10: Síntese quantum dots.....	44
Figura 11. Cella Eletroquímica contendo os eletrodos (trabalho, auxiliar e referência) .	55

Figura 12. Representação esquemática do processo de modificação da superfície do eletrodo de ouro com PAMAM 2G.	56
Figura 13: Espectros de fluorescência de lactoferrina de bubalino das frações salinas dos perfis de salting out (pH 7; 290nm).	60
Figura 14: Espectros de fluorescência da eluição das frações eluídas e reunidas dos 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).	61
Figura 15. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas por Sephacryl S-100: (a) gel SDS – PAGE de concentração 8%; (b) gel SDS – PAGE de concentração 10% e (c) gel SDS-PAGE de concentração 12% (LfS: lactoferrina comercial Sigma (13,42µg/mL; 15,10µg/mL), WfB: Soro neutro (5,10 µg/mL) e LfB: lactoferrina bubalina parcialmente purificada (14,40 µg/mL; 16,80µg/mL)).	62
Figura 16. Espectros de fluorescência dos perfis da titulação do soro ácido no isolamento da Lf pelo pI.	65
Figura 17. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação pelo pI gel SDS – PAGE de concentração 10%. A amostra (1) lactoferrina bovina comercial (SIGMA, USA) (90 µg), (2) soro ácido à pH 4.6 (90 µg), (3): 1ª sobrenadante à pH 5,2 (90 µg), (4): 1ª precipitado ressuspensionado à pH 5,2 (90 µg), (5): 2ª sobrenadante à pH 5,2 (90 µg), (6): 2ª precipitado ressuspensionado à pH 5,2 (90 µg), (7): 1ª sobrenadante à pH 8,3 (90 µg), (8): 1ª precipitado ressuspensionado à pH 8,3 (90 µg), (9): 2ª sobrenadante à pH 8,3 (90 µg) e (10): 2ª precipitado ressuspensionado à pH 8,3 (90 µg).	66
Figura 18: A) Curva de fluorescência da amostra padrão de lactoferrina Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) em tampão Tris-HCl pH 7,30 na faixa de 300nm-550nm $\lambda_{exc} = 290nm$ B) Curva de intensidade de fluorescência em função da concentração.	69
Figura 19: A) Comparação entre a fluorescência no leite de duas espécies em tampão Tris-HCl pH 7,3 na faixa de 300nm-550nm. $\lambda_{exc} = 290nm$. B) Comparação entre fluorescências no sobrenadante do leite das duas espécies em tampão Tris-HCl pH 7,3 na faixa de 300nm-550nm $\lambda_{exc} = 290nm$	70
Figura 20 Estudo espectrofluorimétrico de interação da lactoferrina e quercetina	71
Figura 21 Resposta VPD em ECV/NTC/ para adições sucessivas de BLf em tampão fosfato pH 7.	72
Figura 22: Curva analítica BLf/mmol/L vs Corrente µA em ECV/NTC.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Comparação da sequência de aminoácidos Lf (1-11) em Lf de diferentes espécies de mamíferos.....	32
Tabela 3 Comparação da sequência de aminoácidos da lactoferrampina para diferentes espécies de mamíferos.....	34
Tabela 4 Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína.....	50
Tabela 5. Balanço de massa do processamento do leite de búfalo.	58
Tabela 6:Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de salting – out.....	59
Tabela 7.Balanço de massa do protocolo de isolamento da lactoferrina de búfalo pelo processo de purificação isoeletrica (pI).....	63
Tabela 8. Concentração de proteínas nos perfis do ponto isoeletrico do isolamento da lactoferrina.....	63
Tabela 9: As constantes de interação entre bLf e QDs.	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Ampere
μA	Microampère
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Au	Ouro
Au-SH	Ligação ouro e grupo tiol
BLf	Lactoferrina Bupalina
E	Potencial
E_{1/2}	Potencial de meia-onda
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
Eq	Equação
G	Gramas
g/L	Gramas por litro
I	Corrente
KDa	QuiloDalton
K_F	Constante de formação
LF	Lactoferrina
mL	Mililitro
μol.L⁻¹	Mol por litro
MUA	Ácido 11-mercaptoendecanóico
mV/s	Milivolts por segundo
N	Número de elétrons
PA	Pureza analítica
PAMAM	Poliamidoamina
PAMAM 2G	Poliamidoamina 2ª geração
pH	Potencial hidrogeniônico
QDs	Quantum Dots
R	Coeficiente de determinação

V	Volts
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
λ	Comprimento de onda
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Importância do leite	15
2.1.1	Importância econômica do leite.....	15
2.1.2	Importância social do leite	17
2.2	Produção e produtividade de leite.....	18
2.3	Soro de Leite.....	19
2.3.1	β Lactoglobulina (β -LG)	20
2.3.2	α Lactoalbumina (α -LA)	21
2.3.3	Albumina Sérica Bovina (BSA)	22
2.3.4	Lactoferrina	22
2.3.5	Sítio de ligação ao íon Fe^{3+}	24
2.4	Dinâmica estrutural da lactoferrina.....	26
2.5	Atividade de peptídeos oriundo da lactoferrina.....	29
2.6	Lf 1-11.....	30
2.7	Peptídeo Lactoferrampina	33
2.7.1	Função e aplicações da lactoferrina.....	35
2.7.1.1	Atividade antibacteriana	36
2.8	Métodos para separação de proteínas do leite	39
2.8.1	Purificação de proteínas	39
2.8.2	Precipitação	40
2.8.3	Cromatografia de proteínas	40
2.9	Eletroquímica.....	40
2.9.1	Eletrodos quimicamente modificados.....	41
2.10	Quantum dots	43
2.10.1	Quantum dots e sua interação com proteínas.....	45

2.10.2.	Nano-teranósticos híbridos de proteína-QD	46
2.11.	Biossensores na detecção de componentes alimentares	47
3.	OBJETIVOS.....	48
	Geral	48
	Específicos	48
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1.	Obtenção do leite.....	49
4.2.	Processamento do Leite	49
4.3.	Precipitação salina (<i>Salting out</i>).....	50
4.4.	Quantificação de proteínas.....	51
4.5.	Purificação por Cromatografia de filtração em gel (sephacryl s-100).....	51
4.6.	Estudo Fluorimétrico	52
4.6.1.	Estudos de fluorescência para a interação entre bLf e quantum dots CdSe-CdS(QD)	53
4.6.2.	Estudos de fluorescência para interação da lactoferrina e quercetina.....	54
4.7.	Estudo Eletroquímico	54
4.7.1.	Modificação do eletrodo (carbono vítreo com Nanotubos de carbono e ouro modificado com PAMAM)	55
4.8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
5.1.	Caracterização da Lactoferrina Bupalino.....	58
5.2.	Processamento do leite bupalino	58
5.3.	PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO	58
5.3.1.	Precipitação Salina (<i>Salting Out</i>)	58
5.3.2.	Eletroforese SDS-PAGE	62
5.4.	Purificação isoelétrica pelo (pI) da lactoferrina	62
5.6.	INTERAÇÃO ENTRE LACTOFERRINA E QUERCETINA	70
5.7.2.	Eletrodo de Au modificado com PAMAM	73

5.8. Estudos de interação entre Lactoferrina e Quantum dots CdSe-CdS.....	77
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8. Considerações finais e perspectivas futura.....	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

O leite é um alimento completo de alto valor nutricional e biológico, sendo uma fonte de proteínas de alta qualidade, rico em aminoácidos, várias vitaminas e minerais como o cálcio. O leite é o principal alimento que contribui para o cálcio (49% da disponibilidade global de nutrientes), vitamina B2 (24%), lisina (18%) e gordura dietética (15%) e contribui com mais de 10% da disponibilidade global de nutrientes para mais cinco aminoácidos indispensáveis, proteínas, vitaminas A, B5 e B12, fósforo e potássio (WILLET,2020). A sua ingestão é recomendada, principalmente, para contribuir com a necessidade diária de cálcio, considerado um nutriente fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea, entre outras funções no organismo (ABEYGUNASEKARA et al, 2022) (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013). Em termos de macronutrientes, o leite é geralmente composto de água (85–87%), gordura (3,8–5,5%), proteína (2,9–3,5%) e carboidratos (5%). Mas em termos de micronutrientes, contém muitos compostos bioativos que incluem vitaminas, minerais, aminos biogênicas, nucleotídeos, oligossacarídeos, ácidos orgânicos e imunoglobulinas. Dessa forma, a ingestão de leite pode atender a uma parcela significativa das necessidades diárias de vitaminas e minerais através do consumo de leite (AHVANOOEI, et al. 2021). Assim, 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).

Presentes em todos os tipos de leite, a proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça do gado, da ração fornecida e do país de origem¹. No leite humano, o percentual das proteínas do soro é modificado ao longo da lactação, sendo que no colostro representam cerca de 80% e, na sequência, esse percentual diminui para 50%³ (REBOUILLAT; ORTEGA-REQUENA, 2015).

As proteínas do soro são frequentemente adicionadas a produtos alimentares devido às suas propriedades. 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). Assim, o soro do leite é uma rica fonte de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), contendo os mais altos níveis conhecidos de qualquer fonte alimentar natural. Sendo importante para os atletas, pois, ao contrário dos demais aminoácidos essenciais, são metabolizados

diretamente no tecido muscular e são os primeiros a serem utilizados durante os períodos de exercício e treinamento de resistência (HARAGUCHI, et al. 2006).

O soro de leite possui componentes bioativos com propriedades antimicrobianas e antivirais, melhoram a defesa imunológica e a saúde óssea, melhoram a atividade antioxidante, ajudam a proteger contra câncer e doenças cardiovasculares e melhoram o desempenho de indivíduos fisicamente ativos, entre outros benefícios (ABEYGUNASEKARA, 2022).

As proteínas do soro apresentam várias propriedades que trazem benefícios à saúde, como a diminuição ao risco de doenças infecciosas e crônicas ao sistema imunológico devido à grande concentração de imunoglobulinas (IgG e IgA), que oferecem efeito protetor (SGARBIERI, 2004).

Entre as várias proteínas do leite, a lactoferrina (LF) é uma proteína multifuncional, que possui propriedades de ligação/transferência de ferro, antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Essas propriedades funcionais dependem intimamente da integridade estrutural da LF, especialmente de sua conformação (WANG, et al. 2017). Além disso, a Lf ajuda a estabelecer uma microflora favorável, consequentemente, promove o crescimento microbiano (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

Com os avanços da nanotecnologia a lactoferrina tem se destacado, na área farmacêutica e médica, onde tem crescido o interesse em estudos interacionais envolvendo *quantum dots* (QDs) e proteínas. *Quantum dots* são estruturas de nanocristais semicondutores amplamente utilizadas em aplicações de bioimagem. Eles podem ser feitos a partir de uma variedade de compostos inorgânicos dependentes do seu modo de aplicação. Quando presentes em fluidos biológicos, essas nanopartículas estão sempre cercadas por proteínas, formando um revestimento de superfície fortemente ligado. Portanto, entender os mecanismos de interação é essencial para determinar a biocompatibilidade de QDs para diversas aplicações biomédicas (RITZ, et al. 2015). Segundo Coelho, 2022 a lactoferrina é uma das proteínas mais promissoras e estratégicas para a formação de complexos funcionais com QDs, devido seu amplo espectro de funções biológicas e seus efeitos benéficos (COELHO, et al. 2022).

O dendrímero PAMAM tem crescido como promissor veículo como carreador de fármacos na medicina moderna devido às suas características únicas, como tamanho previsível e nanométrico, baixa polidispersidade e estrutura globular. Sua arquitetura ramificada e superfície multivalente e alta capacidade de entrega de fármacos, faz desde dendrímero como

um grande candidato para carreador de fármacos, genes, moléculas alvo e agentes de imagens (ABBASI *et al*, 2014)

Nesse trabalho vamos para estudar as propriedades da lactoferrina e sua interação com *quantum dots* (QDs). Onde foi escolhido por ser um dos agentes teranósticos populares que são nanopartículas inorgânicas semicondutoras com muitas vantagens como tamanho controlado, amplo espectro de absorção, alta estabilidade, alto rendimento de fluorescência, o que a torna uma ferramenta muito atraente para aplicações médicas (STEVENATO, 2005).

Os métodos de análise de Lactoferrina são os espectroscópicos e eletroquímicos. Estes últimos, se destacam por apresentar boa sensibilidade, seletividade, estabilidade, baixo custo, capacidade de análise, possibilidade de miniaturização e geração de poucos resíduos. Desta forma, serão avaliados sensores eletroquímicos formado por nanomateriais eletródicos diversos e associados com dendrímero PAMAM.

2 RERERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do leite

2.1.1 Importância econômica do leite

A cadeia produtiva do leite no Brasil se distribui, praticamente, por todo o território nacional, totalizando uma produção em 2019 da ordem de 34,84 bilhões de litros, com um rebanho total de 214,7 milhões de cabeças, das quais 16,3 são de vacas ordenhadas (IBGE, 2020).

Em 2019, as mais de 250 mil vacas ordenhadas em Alagoas produziram o equivalente a 603,8 milhões de litros de leite, com uma produtividade anual de 2.410 litros/animal, a maior da Região Nordeste e superior à média brasileira (2.141 litros).

Os dados são da Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM), recém divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Com pequeno aumento no número de vacas de leite e a melhora na produtividade, Alagoas superou a produção do ano anterior. Em 2018, as 249,8 mil vacas ordenhadas produziram 587,3 milhões de litros de leite (2.351 litros por animal) (IBGE,2019).

A média da Região Nordeste foi de 1.405 litros/animal, com Sergipe (2.253) e Pernambuco (2.212) completando a lista dos três primeiros. Na outra ponta, o Maranhão (628) teve a menor produtividade. No Brasil – por sua vez – somente quatro estados registraram maior produtividade que Alagoas em 2019: Santa Catarina (3.817 litros), Rio Grande do Sul (3.610 litros), Paraná (3.324 litros) e Minas Gerais (3.012 litros) (IBGE,2019).

Os 603,8 milhões de litros de leite produzidos em 2019 representaram 1,7% da produção nacional, posicionando Alagoas no posto de 13º maior produtor do país e 4º da Região Nordeste. Entre os vizinhos, somente Bahia, Pernambuco e Ceará aparecem à frente.

No Brasil, a produção de leite chegou a 34,8 bilhões em 2019 – um aumento de 2,7% em relação ao ano anterior – atingindo um valor de produção de R\$ 43,1 bilhões. Essa alta vem do ganho de produtividade, já que o efetivo de 16,3 milhões de vacas ordenhadas foi 0,5% menor em relação ao ano anterior. Com menos animais produzindo mais leite, a produtividade subiu para 2.141 litros de leite por vaca ao ano.

Rebanho bovino em Alagoas

Os municípios de Viçosa (40 mil cabeças), Palmeira dos Índios (36,5 mil), Chã Preta (32 mil), Major Izidoro (31,1 mil) e União dos Palmares (31 mil) possuem os maiores rebanhos

entre as 102 cidades alagoanas, representando – juntos – 13,8% do rebanho bovino estadual. Já, a participação relativa de Alagoas em relação ao total do Brasil é de 0,6%.

O setor da pecuária leiteira consolida o terceiro ano consecutivo de crescimento da produção. Em 2020, o setor atingiu a maior produção na série histórica, 35,4 bilhões de litros de leite em um único ano. O montante representa avanço de 1,5% ante os 34,9 bilhões de litros produzidos em 2019, no qual a produção havia crescido 2,98% (CNA, 2021).

A região Nordeste segue em terceiro lugar, foram 4,9 bilhões de litros ordenhados em 2020, mas não foi possível repetir o expressivo crescimento de 2019, tendo, no último ano, aumentado a produção em 1,9% e mantendo a representatividade de 14% da produção nacional. Em contraponto, houve decréscimo na produção das regiões Centro-oeste e Norte, representando negativos 0,2% e 4,92%, respectivamente. Nessas regiões foram produzidos 4,3 e 2,1 bilhões de litros, que respondem por 11,6% e 6,1% do montante nacional, respectivamente (CNA, 2021).

O ano de 2021 foi bastante desafiador para a cadeia produtiva do leite no âmbito de margens. Com consumo mais fraco e custos de produção em alta, a rentabilidade da atividade caiu, derrubando também a produção. O volume de leite adquirido pelos laticínios fechou 2021 em 25,079 bilhões de litros, queda de 2,19% em relação a 2020, segundo os dados da Pesquisa Trimestral do Leite do IBGE.

Ao avaliar o comportamento da produção no ano, verifica-se que houve desaceleração ao longo de 2021. No primeiro trimestre, a produção de leite cresceu 2% em relação ao mesmo trimestre de 2020. Porém, nos trimestres seguintes houve queda, com o último trimestre ficando 5% abaixo do volume observado no mesmo trimestre de 2020. O fato foi que no segundo semestre de 2021 os preços do leite perderam força ao produtor, enquanto os custos seguiram em elevação, resultando em piora na rentabilidade.

Na produção por região, o Sul liderou esta estatística, com cerca de 9,8 bilhões de litros adquiridos pelos laticínios, seguido pela região Sudeste, com 9,5 bilhões de litros. Juntas, estas duas regiões representaram 77% do leite inspecionado no Brasil, em 2021 (figura 1). Foi a primeira vez que o Sul liderou essa estatística, mostrando a força da região no mercado. Em 2010, a região Sul respondia por 33% do leite brasileiro, saltando para 39%, em 2021. O restante da produção ficou distribuído entre o Centro-Oeste, com 12% de participação na produção nacional, seguido do Nordeste, com 7,2% de participação, e da região Norte, com 3,9% de participação.

Entre os estados brasileiros, Minas Gerais continua líder absoluto com 6,192 bilhões de litros de leite, sendo responsável por 24,6% da produção nacional. Em seguida, os três estados da região Sul se destacam: Paraná, produziu 14% do leite do Brasil; Rio Grande do Sul, com 13,4%, e Santa Catarina, com 11,7%. Fechando os top10, estão os estados de São Paulo, Goiás, Bahia, Rondônia, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Juntos, esses dez estados responderam por 92,2% da produção adquirida pelos laticínios inspecionados no Brasil, em 2021

2.1.2 Importância social do leite

2.1.2.1 Importância do leite para a alimentação humana

O leite tem sido considerado um alimento básico para as crianças desde o começo da civilização, sendo também um complemento indispensável para a dieta dos adultos.

Dessa forma, o leite e seus derivados representam uma das principais fontes de proteínas e cálcio na dieta da população brasileira, especialmente para as classes de menor poder aquisitivo. Está presente em aproximadamente 40% das propriedades rurais do Brasil, sendo explorada predominantemente por pequenos e médios produtores (NOGUEIRA,2003).

De acordo com Tronco (2003), o leite possui 87% de água, 3,6% de gorduras (extrato seco total), 4,6% de lactose (extrato seco desengordurado), 3,6% de proteína e 0,7% de sais minerais. Sendo fundamental para o ser humano e estratégico para as nações, pois segundo Ferreira (2005), é o produto mais subsidiado pelos países desenvolvidos.

O consumo de leite é importante pelo fato de ser fonte de cálcio, mineral fundamental para formação óssea. O leite deve ser colocado na dieta humana como prioridade. A proteína do leite se destaca com um dos mais nobres componentes, tanto pelo alto teor de aminoácidos essenciais como pela alta digestibilidade. O leite é também um excelente fornecedor de vitaminas A e D (BRITO, 2004).

2.1.2.2 Necessidade de consumo de leite pelo homem

Segundo o Ministério da Saúde recomenda 210 litros de leite/habitante/ano (ZOCCAL; CARNEIRO, 2008). Um aspecto importante e abrangente da qualidade do leite é o teor de sólidos (lácteos, gorduras, proteínas, minerais, dentre outros).

Sob o ponto de vista quantitativo, considerando uma população de 185 milhões de habitantes, população aproximada encontrada no Brasil em 2010 (BRASIL, 2011a), e considerando a produção de 30.715.460 toneladas de leite para aquele ano, o volume produzido foi suficiente para que cada brasileiro tivesse disponível aproximadamente 166 litros por habitante por ano, ou seja, aproximadamente 0,45 litros por dia.

2.2 Produção e produtividade de leite

Em 2019, o Brasil apresenta um dos maiores crescimentos observados entre os maiores produtores no período 2018-2019 (3,5%), abrigando um dos maiores rebanhos produtivos do mundo, atrás apenas da Índia. O total das exportações brasileiras em 2019 foi de US\$ 37,58 milhões (5% da produção mundial), uma variação positiva de 0,5%, em comparação com 2018, equivalendo a um total de 20.565,31 t (Comexstat, 2020).

A produção mundial de leite em 2020 foi estimada em 532,3 milhões de toneladas, aumento de 1,5% frente a 2019 (524,3 milhões de t) e de 6,7% acima do observado em 2016 (498,6 milhões de t)

A pecuária leiteira brasileira apresenta duas características marcantes. A primeira é que a produção ocorre em todo território nacional e a segunda é que não existe um padrão de produção definido. A heterogeneidade dos sistemas de produção é muito grande e ocorre em todas as unidades da federação. Existem propriedades de subsistência, sem a utilização da técnica e com produção diária inferior a 10 litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, usando tecnologias avançadas e com produção diária superior a 60.000 litros dia. A produção de leite no Brasil acontece nas mais variadas condições climáticas e econômicas.

Cabe destacar que a produção leiteira no país, ainda é, em sua maioria, composta por pequenos produtores e, de forma geral, podem ser classificados como pequenos e médios os produtores com produção média diária de 50 a 100 litros (NOGUEIRA, 2019).

Alagoas é o estado do Nordeste que mais produz leite. Em 2019, as mais de 250 mil vacas ordenhadas em Alagoas produziram o equivalente a 603,8 milhões de litros de leite,

com uma produtividade anual de 2.410 litros/animal, a maior da Região Nordeste e superior à média brasileira (2.141 litros) (IBGE,2021).

O rebanho leiteiro de Alagoas tem formação genética basicamente constituída pela raça Girolando, que apesar de deter o menor rebanho de vacas da região Nordeste, com 160.303 cabeças, é o estado da região Norte/Nordeste que apresenta o melhor desempenho em termos de produtividade de leite por animal. A média de produção por vaca no Estado, em 2010, foi de 1.549 litros/vaca/ano, superada apenas pelos estados da região Sul com 2.314 litros de leite por vaca/ano.

2.3 Soro de Leite

O consumo de leite de origem animal pelos humanos iniciou-se a aproximadamente 11.000 anos a.C. O leite de origem bovina é um alimento composto por água (87%), gordura (3,7%), proteína (3,4%), lactose (4,8%) e sais minerais (0,7%) (PELEGRINE,2008).

O leite possui um sistema de proteínas constituído por duas famílias principais de proteínas: caseínas (insolúveis) e proteínas de soro de leite (solúveis). As caseínas representam 80% de todo o estoque de proteínas e podem ser facilmente recuperadas do leite desnatado por precipitação isoeletrica ou coagulação guiada por enzima - ambos liberando soro de leite como subproduto. O perfil das proteínas do soro de leite, incluindo propriedades químicas e físico-químicas gerais, está descrito na Tabela 1. As proteínas do soro incluem β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbumina (α -LA), imunoglobulinas (IG), albumina sérica bovina (BSA), lactoferrina bovina (BLF) e lactoperoxidase (LP), juntamente com outros componentes menores.

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)

2.3.1 β Lactoglobulina (β -LG)

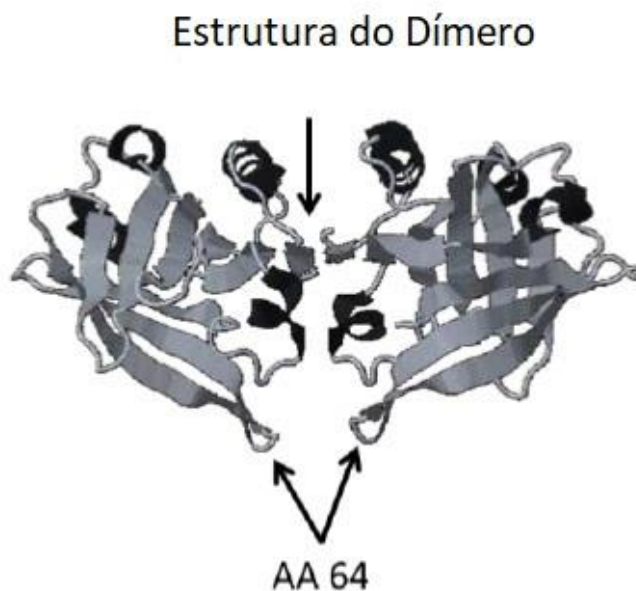
β LG, embora ausente no leite humano, é a principal proteína de soro de leite no leite de vaca ($\sim 3,2$ g / kg). Isto pertence à família das proteínas lipocalin devido à sua capacidade de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas em sua cavidade interna (BAKER, 2009). Possui 162 aminoácidos, uma massa molecular de 18,3 kDa e apresenta mais de dez variantes genéticas conhecidas, embora as isoformas A e B sejam as mais comuns (CHEN, 1995).

β -LG é uma proteína ácida que apresenta um ponto isoelétrico de 5,1 / 5,2 (respectivamente para isoformas A e B) (PIHLANTO-LEPPALA,2000). Possui cinco resíduos de cisteína (Cys), quatro envolvidos em duas pontes dissulfeto e o outro grupo tiol é livre, mas oculto no centro da estrutura β -LG. A temperatura de desnaturação (Tmax) desta proteína é de cerca de 75 ° C e os resíduos Cys apresentados na estrutura são essenciais para garantir a termoestabilidade da proteína (SUETSUNA,1998).

A estrutura do β -LG é semelhante das proteínas de ligação ao retinol, apesar de pouco leite retinol endógeno está ligado à β -lactoglobulina. Embora o β -LG tenha vários locais de ligação para ligantes hidrofóbicos, como ácidos graxos e vitaminas,

β -LG está principalmente em um estado monomérico abaixo de pH 3,5 e acima de pH 7,5 e é capaz de formar dímero não covalente estável em equilíbrio com a forma monomérica entre os dois valores de pH (YANG, 2005) Os resíduos 145 a 153 estão implicados na interface do dímero (TSURUKI, 2003), como ilustrado em Figura 1. No estado dimérico da proteína, o resíduo 64 está próximo da interface do dímero, resultando em alta zona eletronegativa próxima à interface do dímero para os homodímeros β -LG A comparado com homodímeros β -LGB ou heterodímeros β -LGA / β -LGB (PIHLANTO-LEPPALA,2000).

Figura 1. Estrutura do Dímero β - LG



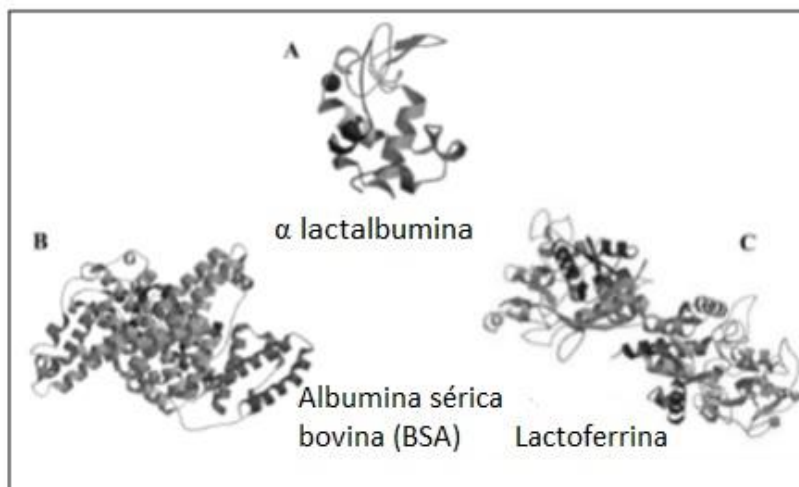
Fonte: Sreedhaka,2011

2.3.2 α Lactoalbumina (α -LA)

α -LA é a segunda proteína de soro de leite mais importante em termos quantitativos (~ 1,2 g / kg).

Ao contrário de β -LG, α -LA está presente no leite de todas as espécies de mamíferos. Tem 123 AA, um peso molecular de 14,2 kDa e um pI entre 4,3 e 4,7. Esta proteína tem um alto similaridade com a lisozima da clara de ovo da galinha (LYS), essas duas proteínas homólogas têm 54 AA idênticos e 23 outros são estruturalmente similares (VAN DER KRAAN, 2004). A estrutura terciária α -LA é mostrada em Figura 2.

Figura 2. Estrutura terciária de (A: α lactalbumina), (B:BSA) e (C:Lactoferrina).



fonte: Sreedhaka,2011

2.3.3 Albumina Sérica Bovina (BSA)

Embora sua concentração no leite seja relativamente baixa ($\sim 0,4$ g / kg), a BSA é uma proteína importante no sangue para o transporte de moléculas. Possui 582 aminoácidos e um peso molecular de 66,4 kDa (SUETSUNA, 2004). A BSA é uma proteína monomérica que apresenta 17 pontes dissulfeto e apenas uma cisteína livre (Figura 2.2 B). Essa proteína e albumina sérica humana (HSA) compartilham 75% de identidade de sequência (BAKER, 2009).

A BSA também é uma proteína ácida, com um pI em torno de 4,9. Sua temperatura de desnaturação é cerca de 60°C , embora sua termoestabilidade possa ser aumentada pela ligação de hidrofóbicos ligantes (BAKER, *et al* 2009) (ALMAAS, *et al* 2006).

2.3.4 Lactoferrina

2.3.4.1 Estrutura Da Lactoferrina (Lf)

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). A Lf também é encontrada em secreções de mamíferos como leite, colostro, lágrimas, saliva, líquido

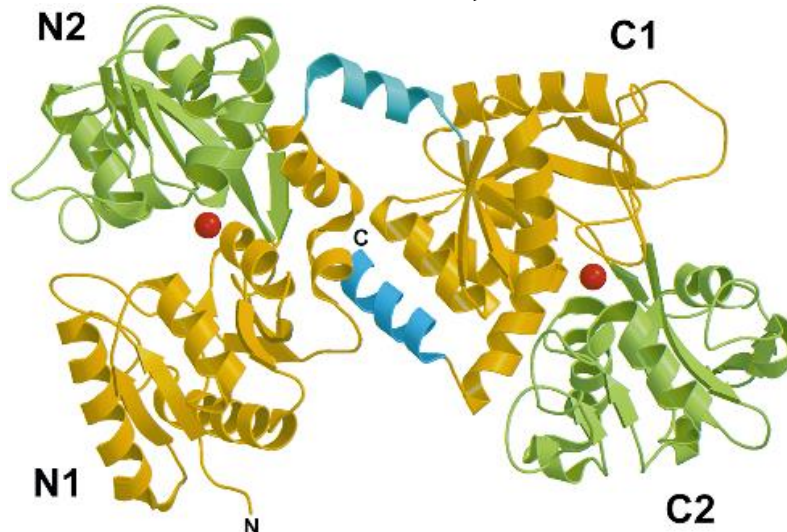
nasal e brônquico, bile hepática, estômago, intestinos e urina (ELNAZ et al., 2016; FARNAUD; EVANS, 2003; GARCÍA-MONTOYA et al., 2012b).

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 os 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%.

A Lfs tem a característica de uma proteína básica carregada positivamente, que possui um ponto isoelétrico (pI) de 8,0 a 8,5 (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). A Lf é formada por uma cadeia polipeptídica simples dobrada em dois lobos simétricos (lobos N e C), altamente homólogos entre si (33 - 41% de homologia) (Figura 3). A cadeia polipeptídica de aminoácidos de 1–332 N terminal e a cadeia polipeptídica de aminoácidos de 344–703 C terminal é composta de estruturas de folhas com hélice e com pregas que criam dois domínios para cada lobo (domínios I e II) (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

Em cada lobo consiste ainda em dois sub-lobos ou domínios, que formam uma fenda na qual o íon férrico (Fe^{3+}) está fortemente ligado em cooperação sinérgica com um ânion carbonato (CO_3^{2-}) (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009). Esses domínios são chamados N1, N2, C1 e C2, respectivamente. Na lactoferrina bovina, N1 representa as sequências 1–90 e 251–233, N2 é 91–250, C1 é 345–431 e 593–676 e C2 é 432–592; esses dois lobos estão conectados pela sequência de aminoácidos 334-344 que representa a região dobradiça, que é uma conformação em α -hélice com três voltas e cumpre um papel durante a abertura e o fechamento dos domínios (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000), oferecendo uma flexibilidade a molécula.

Figura 3. 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



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

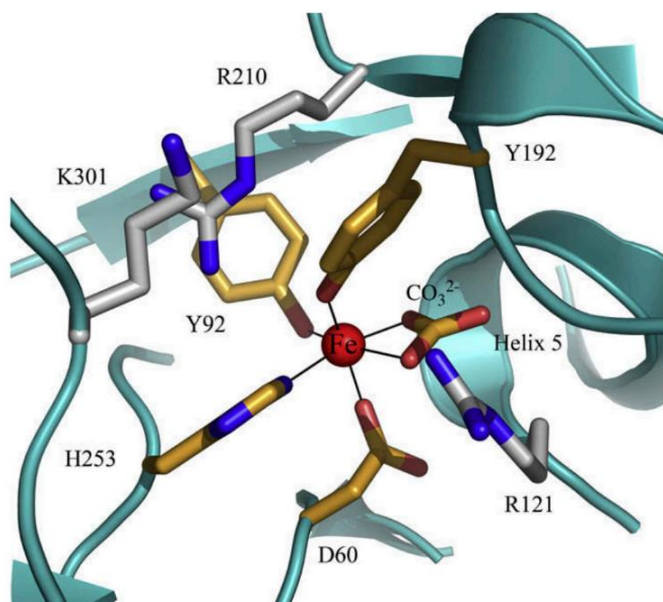
2.3.5 Sítio de ligação ao íon Fe^{3+}

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 4) 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 íons 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).

O estudo espectroscópico e a estrutura 3D sugerem que o ânion CO_3^{2-} se liga primeiro, neutralizando a carga positiva do resíduo de arginina (Arg-121 no lobo N e Arg-465 no lobo C) (ROSA et al., 2017). A participação do ânion CO_3^{2-} no vínculo de coordenação do ferro parece ser ideal para a ligação reversível ao ferro, uma vez que a protonação do ânion CO_3^{2-} é

um primeiro passo provável na ruptura do local do ferro a pH baixo (BAKER; BAKER, 2005; BAKER; BAKER; KIDD, 2002).

Figura 4. 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 a 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, (2005).

Os resíduos de lisina na superfície externa da lactoferrina podem ser usados para acoplar covalentemente moléculas ou aglomerados, permitindo que novas funcionalidades sejam adicionadas à proteína (BREUER; CABANTCHIK, 2001; CARMONA et al., 2014; MOOSMANN et al., 2011; NOJIMA et al., 2008).

Devido à sua capacidade de ligar reversivelmente Fe^{3+} , a Lf pode existir livre de Fe^{3+} (apo-Lf) ou associado a Fe^{3+} (holo-Lf), e possui uma conformação tridimensional diferente, dependendo se deve ou não está ligado a Fe^{3+} . A ligação e liberação de metais são, portanto, associadas a alterações conformacionais em larga escala nas quais os domínios fecham sobre o íon metálico ligado ou abrem para liberá-lo (BAKER; BAKER, 2009; ROSA et al., 2017).

2.4 Dinâmica estrutural da lactoferrina

A forma fechada saturada de ferro (holo-Lf) é altamente estável e mais resistente à digestão por proteases em comparação com a forma aberta não saturada (apo-Lf) (BAKER; BAKER, 2012; ROSA et al., 2017). A forma apo livre de metal, no entanto, é flexível e mais propensa a desnaturação térmica e proteólise (BAKER; BAKER, 2009).

O estudo biofísico mostram que a estrutura de lactoferrina livre de ferro (apo-Lf) é muito menos compacta do que a forma holo e que uma grande mudança conformacional acompanha a ligação e liberação do metal (BAKER; BAKER, 2005). Devido à estrutura comum entre as Lfs, é possível modelar suas conformações usando dados cristalográficos de outras espécies de Lfs (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012a).

O estudo cristalográfico gerou uma visão imprevista da dinâmica da molécula apo-Lf. Onde as estruturas proteicas são flexíveis ou quando existe um equilíbrio em solução entre diferentes estados conformacionais, a cristalização pode selecionar preferencialmente uma estrutura dentre as disponíveis; o equilíbrio muda quando uma estrutura é 'presa' no cristal (BAKER; BAKER, 2009).

A natureza dessa alteração conformacional foi demonstrada pela primeira vez por uma análise da estrutura cristalina da apo-lactoferrina humana (apo-Lf) (BAKER; BAKER, 2005).

Os estudos cristalográficos em apo-Lf humano mostraram que a liberação de ferro envolve movimentos de domínio do corpo rígido em cada lobo, nos quais um domínio se afasta do outro para abrir a fenda de ligação. Esse movimento é possibilitado por uma dobradiça em dois fios polipeptídicos que correm atrás de cada local de ligação do ferro (BAKER; BAKER, 2009; GERSTEIN et al., 1993; JAMESON et al., 1999).

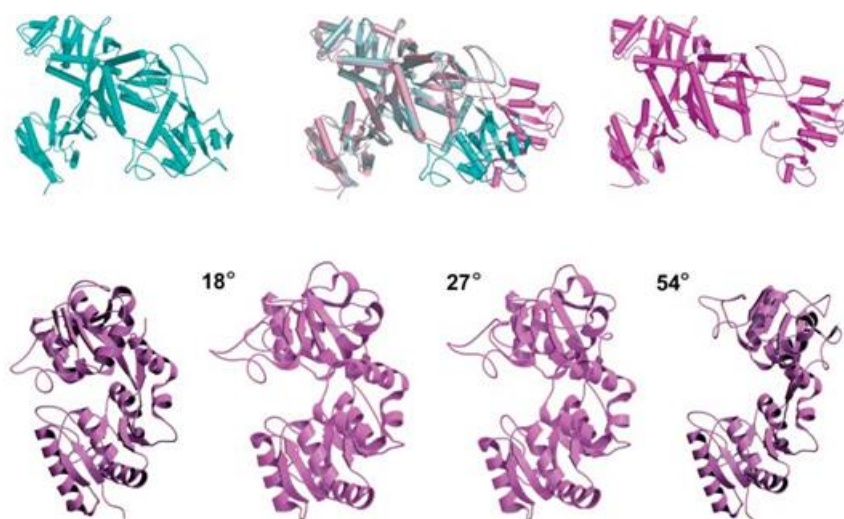
A apo-Lf humana mostrou que a estrutura da fenda de ligação ao lobo N estava aberta, como resultado de uma rotação do corpo rígido a 54° de um domínio (N2) em relação ao outro (N1) (Figura 7); uma dobradiça em dois filamentos polipeptídicos que correm atrás do local de ferro media esse movimento do domínio. Curiosamente, nessa estrutura, o lobo C ainda estava fechado, embora nenhum ferro estivesse ligado, e isso provou ser uma pista importante para o comportamento dinâmico da apo-proteína (BAKER; BAKER, 2005).

Desde então, a estrutura de uma segunda forma cristalina de apo-Lf humana mostrou que o lóbulo C também adota formas abertas, através do mesmo tipo de mudança conformacional que foi observada no lobo N; nessa estrutura, o lobo C de uma das duas moléculas de apo-Lf na unidade assimétrica é aberto em 18 ° e o outro em 27 ° (BAKER; BAKER; KIDD, 2002). As estruturas cristalinas das formas apo de outros Lfs e Tfs mostram maior diversidade (Figura 5). A estrutura cristalina do apo-Lf de equino provou ter ambos os lobos fechados (SHARMA et al., 1999), enquanto a do apo-Lf de camelo tem ambos os lobos bem abertos (BAKER; BAKER, 2005; KHAN et al., 2001).

A partir dessa variedade de estruturas apo-Lf que, na ausência de um íon metálico ligado para bloquear os dois domínios de cada lobo, a forma apo é flexível. Embora provavelmente exista principalmente na forma totalmente aberta (ou seja, com os dois lóbulos abertos), como implica na dispersão da solução em ângulo pequeno (BAKER; BAKER, 2005), a pequena diferença de energia entre as formas aberta e fechada permite também amostrar o estado fechado de tempos em tempos (BAKER; BAKER; KIDD, 2002). Essa diferença de energia pode ser maior nas Lfs de algumas espécies do que em outras - por exemplo, a Lf de camelo parece favorecer a estrutura apo totalmente aberta mais do que outros Lfs e a Lf de cavalo um pouco menos (KHAN et al., 2001). No entanto, as estruturas cristalinas também refletem o fato de que a cristalização pode selecionar um dentre vários estados conformacionais presentes na solução, de modo a otimizar o empacotamento do cristal (BAKER; BAKER, 2005).

Um ponto importante, no entanto, é que as alterações conformacionais que diferenciam as formas holo e apo de Lf são simples movimentos de domínio. Os únicos resíduos cuja exposição ao solvente muda são aqueles que estão dentro da fenda de ligação de cada lobo e um pequeno número na região da dobradiça, e a grande maioria da superfície molecular não é afetada - por exemplo, o domínio lactoferricina centrado na hélice 1 permanece igualmente exposto em ambas as formas (BAKER; BAKER, 2005).

Figura 5. Variabilidade na abertura de domínio em apo-Lfs, observada em diferentes estruturas cristalinas. Na parte inferior, são mostradas a estrutura fechada (como no lóbulo N de apo-Lf de equino e lóbulos C de apo-Lf de equino e humano); duas estruturas parcialmente abertas (vistas para estruturas do lóbulo C da apo-Lf humana); e a estrutura totalmente aberta (vista para o lóbulo N da apo-Lf humana e ambos os lóbulos da apo-Lf do camelo). Acima à esquerda está a estrutura apo-Lf humana "um aberto, um fechado" (lóbulo N à esquerda, lóbulo C à direita), mostrada em azul-petróleo, e acima à direita está a estrutura apo-Lf de camelo "ambos os lóbulos abertos", em rosa. No meio, acima, as duas estruturas são sobrepostas na base de seus N-lobos, mostrando a grande diferença nas orientações de seus domínios C2.



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

A dinâmica, conforme implícita nas estruturas de cristal da apo-Lf, é extremamente importante para a ligação do ferro. Se a estrutura aberta normalmente característica da apo-proteína puder ocasionalmente provar o estado fechado, mesmo que apenas de forma transitória, então (i) os domínios se abrirão imediatamente novamente se nenhum ferro estiver presente no domínio 2 ou (ii) se o ferro estiver presente se ligará aos ligantes Asp e His quando entrar em contato com eles, fechando os domínios (BAKER; BAKER; KIDD, 2002).

Compreender a dinâmica estrutural de Lf é importante para entender suas várias atividades biológicas. A forma holo ligada a ferro de Lf é conformacionalmente rígida e muito estável; o ferro ligado é removido apenas em pH baixo ou usando agentes quelantes de moléculas pequenas muito fortes (BAKER; BAKER, 2009).

A forma apo livre de metal, no entanto, é flexível e mais propensa a desnaturação térmica e proteólise. Presume-se que íons metálicos se liguem à forma totalmente aberta de apo-Lf, que permite acesso irrestrito. A ligação inicial é a um domínio, mas como a proteína

coleta o estado fechado, por meio de flutuações térmicas, ela será bloqueada, pois completa sua ligação a ligantes no outro domínio (BAKER; BAKER, 2009; BAKER; BAKER; KIDD, 2002).

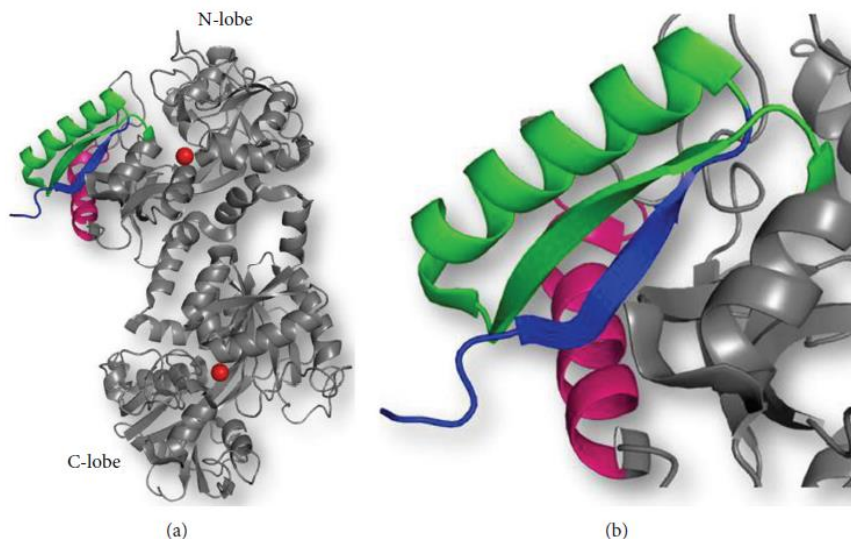
2.5 Atividade de peptídeos oriundo da lactoferrina

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. Os peptídeos antibacterianos LF1-11, lactoferrampina e lactoferricina 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 (Figura 6). Os três peptídeos foram estudados com algum detalhe (BRUNI *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2013). Os peptídeos LF1-11, lactoferrampina e lactoferricina possui sequências que indicam que estes peptídeos pertencem à metade N-terminal da lactoferrina (Figura 7). A 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).

Esses peptídeos, todos do lóbulo N da lactoferrina, mostram uma semelhança notável com os peptídeos antimicrobianos catiônicos encontrados em outras espécies de invertebrados e vertebrados. Esses peptídeos são conservados na lactoferrina, estrutural e funcionalmente na maioria das espécies. Embora possa haver pequenas variações na sequência e nas características conformacionais entre esses peptídeos de lactoferrina de várias espécies, a estrutura básica tende a ser semelhante e conservada. Isso indica que esses peptídeos desempenham um papel significativo na função antimicrobiana dessa proteína (SINHA *et al.*, 2013).

Figura 6 (a) Estrutura geral da lactoferrina mostrando as posições dos peptídeos LF1-11 (azul), lactoferrampina (rosa) e lactoferricina (verde) no lobo N-terminal. (b) A estrutura ampliada mostrando a posição dos peptídeos em detalhes.



Fonte: Sinha et al., (2013)

2.6 Lf 1-11

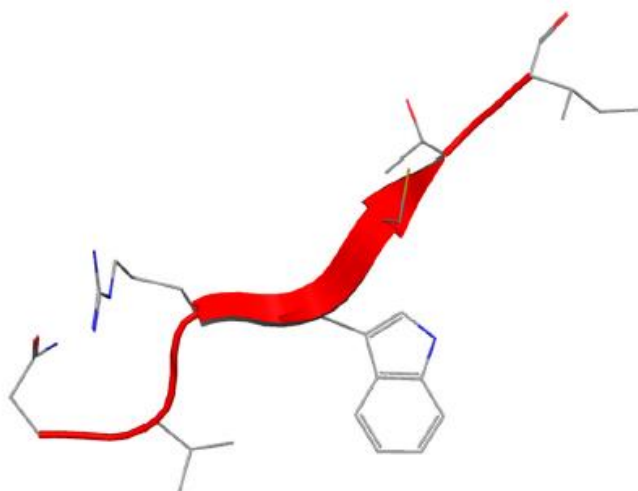
Lf (1–11) é o oligopeptídeo que inclui os primeiros onze resíduos de aminoácidos da molécula Lf (Figura 7). A comparação da sequência de Lf (1-11) de seis espécies de mamíferos (Tabela 2) mostra que algumas características importantes, como a natureza altamente catiônica do peptídeo, são mantidas ($pI > 11$, 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. A investigação das propriedades estruturais e dinâmicas em água e solventes que mimetizam membrana mostram que hLf (1-11) efetivamente interage com a membrana, enquanto o peptídeo de controle (um análogo embaralhado) não mostrou tal conformação (BRUNI et al., 2016).

Este peptídeo demonstrou ser altamente eficaz contra cinco cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e várias espécies de *Candida* sp (SINHA et al., 2013). Estudos mostram claramente que hLf (1–11) tem a

capacidade de reduzir a osteomielite, com resultados microbiológicos semelhantes aos da gentamicina (FABER *et al.*, 2005). Em um estudo anterior, a injeção intravenosa de hLf (1-11) a 0,1 ou 1 nmol reduziu com sucesso as infecções musculares murinas (1×10^7 CFU) causadas pela cepa de *S. aureus* resistente à metilicina 2141 (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *S. aureus* 25923 e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (DIJKSHOORN *et al.*, 2004). Foi observado o efeito antibacteriano do peptídeo LF1-11 nas duas primeiras argininas no N-terminas da Lmactoferrina humana, bem como foi observado no LF1-11 a atividade candidacida quando ocorre a substituição da segunda ou terceira arginina por alanina. Além disso, enquanto LF1-11, LF2-11 e LF3-11 mostraram atividades candidacidas comparáveis, o mesmo foi encontrado comprometido no caso de LF4-11 (SINHA *et al.*, 2013).

Segundo os estudos da atividade antifúngica *in vitro* e a atividade *in vivo* de hLf (1-11) contra *C. albicans* resistente ao fluconazol investigada em camundongos neutrocitopênicos infectados com *C. albicans* Y01-19. Observou-se 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).

Figura 7 Estrutura do peptídeo Lf (1-11)



Fonte: Bruni et al., (2016).

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).

O mecanismo de ação antimicrobiana 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).

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).

2.7 Peptídeo Lactoferrampina

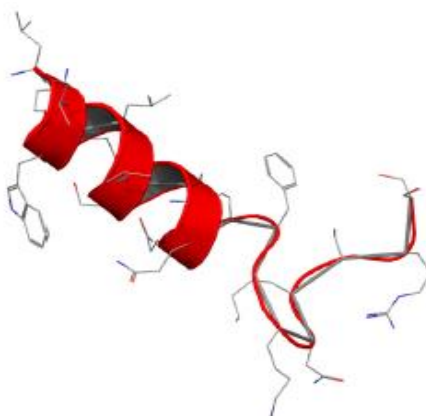
A lactoferrampina (Lfampin) foi recentemente identificada como sendo de potencial interesse por varredura de sequência, com base na característica comum de peptídeos antimicrobianos: uma carga altamente positiva, um domínio hidrofóbico e, portanto, um caráter anfipático (BRUNI et al., 2016). Composta pelos resíduos 268-284 no domínio N1 da lactoferrina, foi identificada como um peptídeo antimicrobiano e desempenha um papel fundamental nas atividades mediadas pela membrana da lactoferrina. Exibe ampla ação antimicrobiana contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, notavelmente, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, bem como atividade candidacida (SINHA et al., 2013).

A estrutura da lactoferrampina revelou uma alfa-hélice anfipática que começa com o N-terminal e termina no 11º resíduo, seguido por uma cauda C-terminal (Figura 8) (SINHA et al., 2013). A comparação de sequência de Lfampin de seis espécies diferentes mostra uma preponderância uniforme de resíduos de aminoácidos catiônicos entre os resíduos hidrofóbicos (Tabela 3). Como um peptídeo antimicrobiano, a Lfampin desempenha um papel fundamental nas atividades mediadas por membrana de Lf (VAN DER KRAAN et al., 2004). Após a descoberta inicial de LFampin 268-284 (produzido por química de fase sólida), uma sequência ligeiramente mais longa (produzida pela ação de uma única endopeptidase em bLf) foi publicada que incluía uma região de capa de hélice N-terminal adicional, Asp-Leu-Ile (BRUNI et al., 2016).

A conformação helicoidal deste peptídeo foi considerada crítica para a potência contra bactérias gram-positivas, conforme estabelecido quando as atividades bactericidas de dois peptídeos lactoferrampina, lactoferrampina 265-284 e lactoferrampina 268-284, foram comparadas. A lactoferrampina 265-284, que consiste em três resíduos adicionais, Asp-Leu-Ile, mostrou uma especificidade mais ampla, uma vez que a sequência Asp-Leu-Ile aumenta a tendência desse peptídeo para assumir uma conformação alfa-helicoidal. Ambos os peptídeos possuíam atividade bactericida contra certas espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Em comparação com a lactoferrampina 268-284, concentrações mais altas de lactoferrampina 265-284 foram necessárias para matar as bactérias gram-negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A atividade de eliminação expressa como valor de LC50 (a concentração que

produziu 50% de redução nas contagens viáveis dos microrganismos) foi encontrada em cerca de 5,8 $\mu\text{mol} / \text{L}$ para lactoferrampina 268-284, que é cerca de 4 vezes maior do que lactoferrampina 265-284 (SINHA *et al.*, 2013).

Figura 8. Estrutura do peptídeo Lactoferrampina



Fonte: Bruni *et al.*, (2016).

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

Espécies	Nome popular	Sequências
<i>Homo sapiens</i>	Humana	WNLLRQAQEKFGKDKSP
<i>Bovinae</i>	Bovina	WKLLSKAQEKFGKNKSR
<i>Bubalus</i>	Búfalo	WKLLSKAQEKFGKNKSG
<i>Equidae</i>	Equino	WKLLHRAQEEFGRNKSS
<i>Capra aegagrus hircus</i>	Cabra	WELLRKAQEKFGKNKSQ
<i>Camelus</i>	Camelo	WKLLVKAQEKFGRGKPS

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).

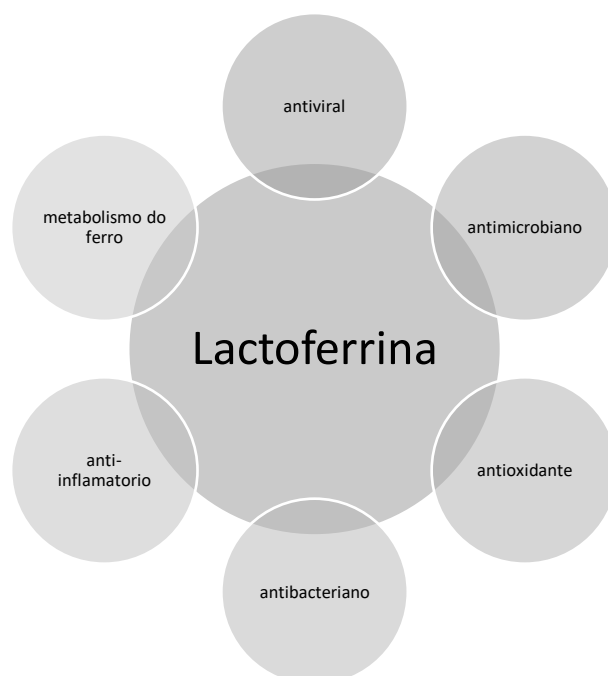
Flores-Villaseñor *et al.*, (2010) Flores *et al.* mostra que a combinação de ampicilina com Lfcin 17-30 ou LFampin 265-284 aumentou o efeito inibitório no crescimento de *S. aureus* (99,9%) para ambos os peptídeos, sugerindo que ocorre um efeito sinérgico. Esses dados sugerem fortemente que Lfcin 17-30 e LFampin 265-284 agem sinérgicamente com antibióticos contra cepas de *S. aureus* multirresistentes *in vitro*

2.7.1 Função e aplicações da lactoferrina

Várias funções foram atribuídas ao LF. É considerado um componente chave na primeira linha de defesa, pois possui a capacidade para responder a uma variedade de mudanças fisiológicas e ambientais (VAN DER STRATE *et al*, 2001). As características estruturais do LF fornecem funcionalidade: forte atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias, fungos, leveduras, vírus (STEIJNS, 2000) e parasitas (MENDIS, 2005); anti-inflamatório e atividades anticarcinogênicas (figura 9) (VAN DER STRATE, *et al* 2001); e várias funções enzimáticas (PIHLANTO, *et al* 2005)

A LF desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis de ferro celular no corpo, demonstrado em vários estudos, principalmente no leite. Várias décadas atrás, foi demonstrado que bebês amamentados não apresentam deficiências de ferro.

Figura 9. Funções biológicas da lactoferrina



Fonte: adaptado de Brock(2010)

2.7.1.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da lactoferrina tem sido amplamente documentada bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em algumas bactérias resistentes ao álcool e ácido. A tabela mostra as bactérias contra as quais a LF mostrou efeito inibitório e o tipo de LF usada. Algumas das bactérias listadas na Tabela são especialmente categorizadas como resistentes a antimicrobianos, como as cepas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e resistentes à meticilina *Klebsiella pneumoniae*. Também foi demonstrado que LF é eficaz contra cepas de *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus mutans*, que podem se conectar à célula hospedeira. (RIPOLLES *et al.*, 2015).

A função bacteriostática de LF se deve à sua capacidade de absorver o Fe^{3+} , limitando o uso desse nutriente por bactérias na infecção local e inibindo o crescimento desses microrganismos, bem como a expressão de seus fatores de virulência (SREEDHARA, 2010).

O mecanismo de ação da LF contra bactérias Gram-positivas é com base na ligação devido à sua carga positiva líquida para moléculas aniônicas na superfície bacteriana, como o ácido lipoteicóico, resultando em redução da carga negativa na parede celular e, assim, favorecendo contato entre lisozima e peptidoglicano (RAMOS-CLAMONT *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que a LF tem a capacidade para impedir a ligação de certas bactérias à célula hospedeira (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009; JENSSEN; HANCOCK, 2009; MORENO-EXPÓSITO *et al.*, 2018).

2.7.1.2 Atividade antiviral

O primeiro relato sobre o efeito antiviral da lactoferrina foi nos estudos realizados pelo grupo de Broxmeyer na década de 1980. Eles mostraram que a lactoferrina afetou a mielopoiese de camundongos inoculados com um complexo de vírus. Então, eles descobriram que a lactoferrina injetada melhorou a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com alguns vírus (WAKABAYASHI, *et al* 2014).

Na década de 1990, os vírus-alvo para os quais a lactoferrina demonstrou exibir atividade antiviral foram propagados para citomegalovírus (CMV), vírus herpes simples, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite C, rotavírus, poliovírus, vírus sincicial respiratório. Van der Strate e colaboradores descreveram que o efeito antiviral da lactoferrina

ocorre na fase inicial da infecção, impedindo a entrada do vírus nas células hospedeiras, seja por bloqueio de receptores celulares, seja por ligação direta às partículas virais (VAN DER STRATE, *et al* 2001).

Em recente artigo de revisão de Berlutti, o vírus da hepatite B (HBV), vírus da parainfluenza (PIV), alfavírus, hantavírus, papilomavírus humano (HPV), calicivírus felino, adenovírus, enterovírus, echovírus, influenza Um vírus, o vírus da encefalite japonesa e o vírus do enrolamento da folha amarela do tomate (TYLCV) foram adicionados como vírus recém-identificados que são inibidos pela lactoferrina . Nesta revisão, os autores descreveram que a lactoferrina pode exercer seu efeito antiviral não apenas na fase inicial de interação de superfície entre o vírus e célula, mas também intracelularmente, pois foi observada a localização nuclear da lactoferrina em diferentes células epiteliais humanas (BERLUTTI, 2011).

O vírus sincicial respiratório humano é inibido por LF em concentrações dez vezes menor do que o encontrado no leite humano. LF também atua contra vírus não envelopados, como adenovírus e enterovírus (BELJAARS *et al.*, 2004).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) continua sendo um dos principais desafios, uma vez que o tratamento atual da síndrome que ela causa, não é completamente eficaz. Estudos *in vitro* mostram que, entre humanos no plasma e nas proteínas do leite, a LF exerce uma forte atividade contra o HIV.

O LF pode bloquear a internalização de certos vírus na célula hospedeira, como o poliovírus tipo 1, que causa poliomielite em humanos, vírus do herpes simplex tipos I e II e citomegalovírus. Para outros vírus, como o vírus da hepatite C (HCV) e rotavírus, em vez de impedir a entrada de LF inibe a replicação viral na célula hospedeira. LF é um modulador do sistema imunológico inato e adquirido (GONZÁLEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2009)

A carga positiva da LF permite que ela se ligue a cargas negativas moléculas na superfície de várias células do sistema imunológico e foi sugerido que essa associação pode desencadear sinalização nas vias que levam a respostas celulares como ativação, diferenciação e proliferação. Observou-se que a LF transportada para o núcleo, pode ligar-se o DNA e ativar diferentes vias de sinalização (SEGANTI *et al.*, 2004).

Além de induzir imunidade sistêmica, a LF pode promover a imunidade e inibir respostas alérgicas. Induz o sistema imunológico sistema contra alérgenos da pele, causando

inibição dose-dependente da migração celular de Langerhans e do acúmulo de células dendríticas (WAKABAYASHI, *et al* 2014)

A LF é secretada no meio, onde mostra atividade anti-inflamatório através da inibição de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucina (IL) -1, IL-2 e IL-6 . No nível celular, a LF aumenta a número de células natural killer (NK), estimula o recrutamento de células polimorfonucleares no sangue, induz fagocitose e pode modular o processo mielopoiético (WAKABAYASHI, *et al* 2014).

Nesse sentido, no último ano houve um aumento pela busca de substâncias naturais com atividade antiviral e anti-inflamatória, como a lactoferrina (Lf) (ROSA, *et al* 2017), que poderia ser um candidato ideal para combater simultaneamente o SARS-CoV-2 infecção, inflamação e desregulação da homeostase do ferro (CAMPIONE, *et al* 2021).

2.7.1.3 Atividade anticarcinogênica

A LF tem a capacidade de modular a produção de citocinas nas células cancerígenas. A LF pode induzir apoptose e parar crescimento tumoral. Também pode bloquear a transição do G1 a S no ciclo celular de células malignas (WANG, 2017).

O tratamento de tumores em camundongos com hLF recombinante (rhLF) inibe seu crescimento em 60% em comparação com um placebo e aumenta a níveis de citocinas anticarcinogênicas como IL-18, além de ativação de células NK e linfócitos TCD8 (CUTONE *et al.*, 2020).

2.7.1.4 Atividade enzimática

LF tem a capacidade de funcionar como uma enzima em algumas reações. Sendo uma proteína do leite com os mais altos níveis de amilase, DNase, Atividades de RNase e ATPase . No entanto, estes não são somente atividades enzimáticas da LF. A base para as várias enzimas enzimáticas de LF atividades é desconhecida RNA (LUZI *et al.*, 2017).

A descoberta das atividades enzimáticas da LF ajudou a explicar vários de seus mecanismos fisiológicos, como proteção contra patógenos microbianos, onde o LF pode inibir parcialmente o crescimento hidrólise de ácidos nucleicos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários (GUEDES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2016).

2.8 Métodos para separação de proteínas do leite

2.8.1 Purificação de proteínas

Geralmente, o isolamento ou separação de proteínas é realizado com base nas propriedades nativas da proteína, como carga, tamanho e hidrofobicidade (MATTHEWS 1984; Ye *et al.* 2000). Em alguns casos especiais, as proteínas são isoladas por ligantes de afinidade (Huse *et al.* 2002). Existe uma ampla gama de tecnologias disponíveis para separação de proteínas com base nas aplicações do usuário final e na viabilidade comercial. As técnicas de separação mais populares para extração de proteínas a partir de misturas brutas são métodos de cromatografia em precipitação ou adsorção de sal ou solvente.

Esses métodos têm sido investigados por várias décadas e estão bem documentados na literatura. No entanto, os processos disponíveis para extração de proteínas em escala comercial e industrial são limitados. Os métodos em escala industrial são divididos principalmente em três categorias: precipitação seletiva, adsorção e filtração por membrana (WINGFIELD, 1998).

Recentemente, as tecnologias de filtração por membrana ou adsorção por membrana (Goodall *et al.* 2008) estão atraindo indústrias de laticínios para o processamento em massa de componentes bioativos com menos complicações no processo. Além disso, sistemas de adsorção expandida de leite ou tanque agitado (descontínuo ou contínuo) provaram ser métodos alternativos em potencial para o processamento em escala industrial (Noel 2007) de misturas complexas (WINGFIELD, 1998).

Embora existam várias tecnologias alternativas de processamento disponíveis para a extração de componentes bioativos de fluidos lácteos, a maioria delas possui suas próprias limitações e desvantagens inerentes. Alguns desses componentes bioativos derivados do leite são suscetíveis a tratamentos agressivos, geralmente empregados em processos de isolamento. Além disso, processos de várias etapas sempre aumentam o custo do produto final e diminuem as atividades e os rendimentos de compostos bioativos sensíveis (Chand, 2006). Considerando todos esses parâmetros, é necessário desenvolver métodos cromatográficos que minimizem a perda ou retenham a bioatividade desses componentes lácteos, maximizando os rendimentos. Devido à crescente demanda e aplicações para essas proteínas / peptídeos menores nas indústrias de saúde, farmacêutica e alimentícia, processos mais robustos e econômicos precisam ser desenvolvidos para produções em massa.

2.8.2 Precipitação

A precipitação tem sido amplamente utilizada no processamento a jusante para recuperação de produtos biológicos, como proteínas, enzimas e outros compostos bioativos. A técnica de precipitação seletiva envolve o ajuste das propriedades físicas dos componentes desejados em soluções brutas pela adição de solventes orgânicos, sais, alterações de pH e / ou aquecimento para promover insolubilidade ou agregação seletiva. O processo mais comum de precipitação de proteínas é a precipitação em altas concentrações de sal (*salting-out*), geralmente sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A precipitação seletiva tem sido o método mais usado na indústria de laticínios para a produção de queijo, ajustando o pH do leite abaixo de 5 (soro ácido) a 40 ° C, o que leva à proteínas de caseína agregadas.

2.8.3 Cromatografia de proteínas

A cromatografia, mais comumente a cromatografia em coluna, está em uso há várias décadas. Este método tem sido amplamente utilizado para isolamento, extração e purificação de biomoléculas que variam de pequenos peptídeos a grandes anticorpos de várias misturas complexas. Geralmente, proteínas e peptídeos são separados por aplicação de métodos de cromatografia adequados com base em suas propriedades físico-químicas, como carga (cromatografia de troca catiônica ou aniônica), tamanho (cromatografia de exclusão de tamanho ou permeação de gel) e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica). Além disso, certas biomoléculas, especialmente anticorpos, são isoladas pela aplicação de métodos de cromatografia de afinidade. Na cromatografia de afinidade, o ligante imobilizado é único e possui uma ligação muito específica ao seu homólogo, chamado antígeno. Os processos de cromatografia podem ser operados em modos descontínuo ou contínuo em colunas de leito compactado, colunas de leito expandido (ou fluidizado) ou tanques agitados (suspensos) (DUONG-LY; GABELLI, 2014).

2.9. Eletroquímica

A eletroquímica envolve fenômenos que provocam uma separação de cargas, isto ocasiona a transferência de cargas, que pode ser homogênea (solução) ou heterogênea (superfície de eletrodo). Para garantir a neutralidade ocorrem duas reações em sentidos

opostos (BRETT, BRETT; 1996). As reações com eletrodos são heterogêneas pois, ocorrem na região interfacial entre o eletrodo e a solução; nesta região a distribuição de carga difere da fase no interior da solução. Sendo que o processo é governado pela estrutura desta região. Os dezenove valores dos potenciais podem ser controlados externamente, logo; é possível controlar o sentido e a extensão do processo eletroquímico (BRETT, BRETT; 1996). As técnicas voltamétricas são as mais utilizadas para estudar os mecanismos e quantificação de compostos.

2.9.1. Eletrodos quimicamente modificados

O reconhecimento específico de um analito pode ser realizado modificando o eletrodo de trabalho usando diferentes tipos de nanomateriais. Devido às boas propriedades os eletrodos quimicamente modificados, são amplamente utilizados para detecção eletroquímica e podem melhorar drasticamente a eficiência. O tipo de material usado para modificar o eletrodo é um fator importante na produção de sensores eletroquímicos confiáveis e de alto desempenho. Assim, avanços nos novos materiais para modificar eletrodos têm um impacto positivo nos resultados obtidos com as técnicas eletroanalíticas. Além disso, o uso de combinações de diferentes tipos de materiais para modificar os eletrodos pode melhorar ainda mais o desempenho analítico dos eletrodos (ZHAO, WANG, LIU, 2017).

Os eletrodos quimicamente modificados possuem espécies ativas imobilizadas na sua superfície, neste caso é costumeiro utilizar a nomenclatura de sensor para tais eletrodos. Quando se modifica a superfície de um eletrodo têm-se como principal finalidade potencializar a interação eletroquímica do sensor com um analito em específico. Então, procura-se aumentar a transferência de elétrons entre as espécies envolvidas, ocasionando um sinal de corrente maior e aumentando a sensibilidade; gerando assim uma resposta melhor quando comparado aos eletrodos sem modificação (HUANG, ZHANG, HU, LI, WENG, CHEN, WANG, HE, ZHANG, BAO, 2014; FERREIRA, 2009; PEREIRA, SANTOS, KUBOTA, 2002).

Segundo a literatura pode-se definir um eletrodo quimicamente modificado como um material condutor ou semicondutor que teve a sua superfície modificada para possuir propriedades desejáveis de modo a interagir melhor com o analito ao qual deseja-se identificar. Portanto, é possível projetar sensores para os mais variados fins e aplicações,

como conversão e armazenamento de energia solar, síntese eletro-orgânica seletiva, eletrônica molecular, dispositivos de exibição eletrocrômicos, proteção contra corrosão e eletroanálise; desde que se tenha os reagentes e nanomateriais químicos adequados para as finalidades almejadas. Sendo assim, a possibilidade de manipular a interação molecular da superfície de um sensor criou uma vasta gama de novas perspectivas/possibilidades para a eletroanalítica (RADI, 2010).

Os dendrímeros são macromoléculas sintéticas com estrutura tridimensional que atuam no transporte de substâncias. Essas moléculas são construídas camada a camada a partir de um núcleo central e a cada nova camada de ramificação cria-se uma nova “geração”, sendo possível a formação de n gerações. Com geometria esférica, bem definida e alto grau de ramificação, os dendrímeros podem interagir com substâncias e meios reacionais polares e apolares, visto que sua estrutura interna, contendo espaços vazios, é majoritariamente apolar e sua superfície apresenta grupos funcionais polares. A primeira família desta classe a ser sintetizada e a mais utilizada, são os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). Essa macromolécula pode interagir com pequenas moléculas do sistema droga-hóspede, promovendo a encapsulação da molécula em sua estrutura dendrítica, resultando em melhorias como solubilidade, adequação, biocompatibilidade e biodisponibilidade da molécula alvo. O estudo do encapsulamento de pequenas moléculas pela estrutura dendrítica é estudado, em sua maior parte, por técnicas eletroquímicas que detectam alterações na atividade redox do composto. Esse tipo de estudo já foi realizado para analisar a interação do PAMAM com β LP e 6CN10, ambos com eletrodo de carbono modificado com o dendrímero (DA SILVA, 2017, CANDIDO, 2018)

Logo, o ideal é desenvolver monocamadas auto-organizadas pois ao formar tais monocamadas procura-se organizá-las o máximo possível visto que assim obtêm-se uma melhor resposta, para isso utiliza-se de grupamentos orgânicos como tióis e alcanotióis sobre a superfície do eletrodo de ouro, pelo fato de a ligação Au-SR é estável e gera uma estrutura extremamente ordenada (FERREIRA, 2009; FRANÇA, 2016).

LI e CHEN (1998) utilizaram uma modificação em eletrodo de ouro com 4-Hidroxi-2-mercapto-6-metilpirimidina para separar e detectar ácido ascórbico juntamente com dopamina. Monocamadas auto organizadas funcionalizadas com grupamentos terminais de: CH_3 , OH, COOH e NH_2 podem alterar o domínio de ligação e de especificidade (DING, CHANG, WU, LAI, CHANG, 2005). DING e colaboradores (2005) estudaram a passagem

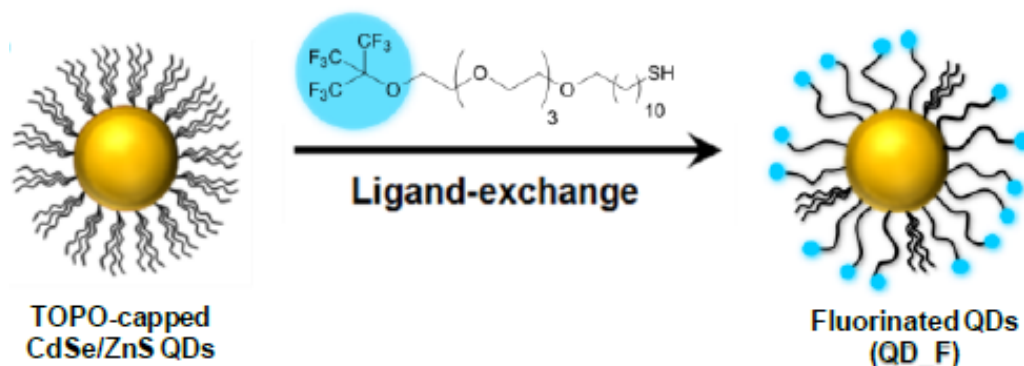
de corrente elétrica utilizando alcanotióis terminados em carboxilo, incluindo: ácido 4,4-ditiodibutírico ($[-S(CH_2)_3COOH]_2$, 4-DTBA), ácido 11-mercaptoundecanóico ($HS(CH_2)_{10}COOH$, 11-MUA), e ácido 16- mercaptohexadecanoico ($HS(CH_2)_{15}COOH$, 16- MHA).

A utilização de nanomateriais inorgânicos para modificar a superfície de eletrodos têm emergido como uma nova alternativa, novos materiais como os Metal Organic Framework (MOFs) tem ganhado cada vez mais aplicações. Os MOFs são atraentes para utilização como sensores na superfície de eletrodos por poderem combinar estruturas altamente porosas com uma variedade de grupos quimicamente funcionais.

2.10. Quantum dots

Quantum dots são estruturas de nanocristais semicondutores amplamente utilizadas em aplicações de bioimagem. Eles podem ser feitos a partir de uma variedade de compostos inorgânicos dependentes do seu modo de aplicação. Os QDs geralmente consistem em um núcleo semicondutor CdSe <10 nm cercado por um invólucro inorgânico composto por ZnS (Figura 10). O complexo núcleo-invólucro é revestido com um polímero para tornar a partícula solúvel em água, seguido de funcionalização com, por exemplo, estreptavidina para preparar QDs para uso em imunoquímica. O tamanho final de QDs imunoquimicamente funcionais é de 10^{-15} nm, que está na faixa de tamanho de macromoléculas (DUONG-LY; GABELLI, 2014).

Figura 10: Síntese quantum dots



Fonte: Carrion, et al, 2018

Os QDs são caracterizados por ampla faixa de absorção e estreita faixa de emissão simétrica. Importante para uso como sondas biológicas, os QDs absorvem e emitem luz através de um amplo espectro de comprimentos de onda, do visível ao NIR(CARRION, et al 2018) e podem ser excitados com qualquer comprimento de onda do UV ao vermelho(DUONG-LY; GABELLI, 2014).

QDs são nanomateriais inorgânicos com perspectivas inovadoras em função do efeito quântico e dimensões nanométricas (AMELIA, LINCHEMEAU, SILVI, CREDI, 2012).

Sistemas que utilizam qds estão sendo constantemente estudados para ser aplicado em pesquisas relacionadas a biologia, bioquímica e áreas afins da saúde, devido a fotoluminescência altamente definida e boa estabilidade físico química. CdSe qds sempre foi objeto de estudo por causa de suas propriedades luminescentes e um custo relativamente baixo (WANG, ZHANG, MAO, SONG, NIU, JIN, TIAN, 2012).

Exatamente por apresentarem ótimas propriedades ópticas e eletrônicas; e ainda sendo que uma síntese realizada com esmero gera uma boa estabilidade físico química (SILVA, NETO, SILVA, MORAIS, DANTAS., 2013; SILVA, SILVA, SILVA, LUZ, SILVA, DEUS, DANTAS, 2014), sensores utilizando qds apresentam um nível considerável de sofisticação e são promissores para aplicações em análises com matrizes reais, apesar de a maioria dos sistemas pesquisados dependerem da transdução óptica (DROZDOV, KOCHNEV, DOBROVOLSKY, POPELO, RUMYANTSEVA, 2013;

DRADRACH, BARTKIEWICZ, MINIEWICZ, 2014; CHEN, JIN, WU, TUNG, TANG, 2014; ZHAO, TANG, XIANG, JI, YUAN, ZHAO, YU, TAI, SONG, 2014), alguns estudos com base em sinais eletroquímicos também são relatados (DU, DING, TAO, LI, 2008; PINWATTANA, WANG, LIN, WU, DU, LIN, 2010; HUANG, ZHANG, HU, LI, WENG, CHEN, WANG, HE, ZHANG, BAO, 2013).

2.10.1. *Quantum dots* e sua interação com proteínas

A determinação do traço das concentrações biomoleculares é de importância primordial para a descoberta e desenvolvimento de mecanismos biomoleculares e diagnóstico médico.

Os QDs representam uma nova classe de etiquetas fluorescentes que atraíram muito interesse em biossensibilidade e bioimagem devido às suas propriedades ópticas únicas (CARRION, et al 2018). Em comparação com os agentes de coloração clássicos, os espectros de emissão de fluorescência de QDs podem ser continuamente ajustados alterando o tamanho das partículas e um único comprimento de onda pode ser usado para excitação simultânea de QDs de tamanhos diferentes. Além disso, os QDs passivados pela superfície são altamente estáveis contra a fotobranqueamento e têm picos de emissão simétricos e estreitos com cerca de 25 a 30 nm de largura total na metade do máximo.

No entanto, devido à crescente extensão da nanotecnologia nas ciências biológicas, é imperativo desenvolver um entendimento detalhado de como as entidades biológicas e, no nível mais básico, as proteínas, podem interagir com partículas em nanoescala. Além disso, relativamente pouco se sabe sobre os efeitos da temperatura nas interfaces QDs - sistemas biológicos. Como os QDs são usados intensamente como marcador fluorescente em aplicações biológicas, esse efeito pode desempenhar um papel importante em seu uso. Vários estudos anteriores foram dedicados a entender melhor a influência da luminescência na espectroscopia de fluorescência de QDs bioconjugados do núcleo / casca (CARRION, et al 2018) (SHRIVER, D. F.; ATKINS P. 2008; FERREIRA, RANGEL 2009).

Desde a primeira vez que nanopartículas fluorescentes de semicondutores (pontos quânticos) foram sintetizadas, eles são amplamente explorados devido a suas possíveis aplicações em muitos campos, incluindo remédios. Comprimento de onda de emissão ajustável, amplos espectros de absorção e emissão nítidos, alta quantum rendimento (QY), resistência à

degradação química e foto branqueamento e versatilidade na modificação da superfície de QDs marcadores fluorescentes muito promissores (VASUDEVAN et al. 2015).

Apesar de todas as propriedades físicas, alguns problemas devem ser resolvidos antes que os pontos quânticos possam ser aplicados com sucesso na medicina. CdSe geralmente são insolúveis em água e são feitos de materiais tóxicos para objetos biológicos. Para torná-los adequados para aplicação na medicina, a superfície do *quantum dots* deve ser modificado para torná-los solúveis em água e resistentes a meios biológicos. Após a injeção de *quantum dots* em organismos, eles são expostos a várias biomoléculas (íons, proteínas, células sanguíneas, etc). Isso poderia levar degradação do revestimento de CdSe no próprio ponto. Nesse caso, íons Cd^{2+} tóxicos são liberados e pode causar danos às células ou até a morte celular (AMELIA, LINCHENEAU, SILVI, CREDI, 2012).

Recentemente, a interação de *quantum dots* com biomoléculas atraiu muito interesse, e é estudado usando vários métodos, como, gel eletroforese, espalhamento dinâmico de luz, exclusão de tamanho cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de correlação de fluorescência foi demonstrado que a interação de CdSe com moléculas biológicas pode melhorar as propriedades ópticas e a sua estabilidade ou pode levar de maneira oposta à sua degradação

2.10.2. Nano-teranósticos híbridos de proteína-QD

Os QDs podem ser hibridizados com proteínas por meio de acoplamento químico ou aprisionamento físico. Por exemplo, QDs de grafeno foram conjugados com sucesso à superfície de nanopartículas de albumina de soro humano (NPs) carregadas com gencitabina. Em estudo realizado por Nigam *et al.* Foi observada uma forte fluorescência verde dentro das células Panc-1 tratadas com os NPs, demonstrando sua captação eficiente em células tumorais. Por outro lado, verificou-se que o encapsulamento de CdSe QDs em NPs de gelatina melhora a biocompatibilidade de QD, onde os NPs de QD-gelatina não exibem efeito tóxico nas células até uma concentração de 5 mg/mL, mantendo suas fortes propriedades fluorescentes (SEGATO, 2011).

Em outro estudo, as nanoesferas multi-fluorescentes foram desenvolvidas por encapsulamento físico de diferentes tamanhos de CdTe / CdS QDs juntos em nanoesferas de albumina de soro bovino (BSA) via secagem por pulverização. A fluorescência das nanoesferas

pode ser modificada alterando o tamanho dos QDs. As estabilidades típicas de fluorescência das nanoesferas QD-BSA foram estudadas e verificou-se que, quando as nanoesferas QD-BSA continham uma alta razão molar de QD: BSA, a emissão de fluorescência diminuiu 4,06% após ser continuamente irradiada (em 365 nm) durante 1 h. Esses resultados revelaram que a fluorescência das nanoesferas QD-BSA poderia ser usada para observação de fluorescência a longo prazo em áreas de pesquisa biomédica (CHIARI-ANDRÉO *et al.*, 2019).

2.11. Biossensores na detecção de componentes alimentares

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a definição de um biossensor pode ser dada como "um dispositivo integrado independente, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico ou bioreceptor), que está em contato espacial direto com um transdutor. O transdutor é usado para converter o sinal (bio) químico resultante da interação do analito com o bioreceptor em um eletrônico. A intensidade do sinal é proporcional à análise da concentração". Biomoléculas diferentes (isto é, anticorpo, enzima, células, sequência de oligonucleotídeos, etc.) e moléculas biomiméticas (polímero com impressão molecular, aptâmero, etc.) podem ser usadas como bioreceptores (SILVA *et al.* 2010).

Atualmente, existe uma grande preocupação da população mundial com a qualidade dos alimentos. Com isso, o desenvolvimento de biossensores tem crescido e ocupado um espaço cada vez maior no mercado, devido ao seu baixo custo e alta eficiência (DUTRA, *et al.* 2008).

Nas análises de qualidade dos alimentos, os biossensores tem sido aplicados principalmente na detecção de compostos químicos e biológicos. Logo, a análise da composição dos alimentos com o uso dos biossensores permite a quantificação desses componentes que são encontrados naturalmente e aqueles que são adicionados para o seu enriquecimento, como algumas vitaminas e minerais (DUTRA, *et al.* 2008).

3. OBJETIVOS

Geral

Purificar, caracterizar a lactoferrina bubalina (*Bubalus bubalis*), estudar sua associação com quantum dots e molécula bioativa e avaliar sua determinação utilizando sensores a base de Au/PAMAM

Específicos

- ✓ Desenvolver metodologias de separação e purificação de lactoferrina do leite de búfala por cromatografia de filtração em gel;
- ✓ Caracterizar a lactoferrina do leite por eletroforese
- ✓ Analisar associação da Lf, PAMAM, *quantum dots* CdSe/CdS por método espectrofluorométrico;
- ✓ Analisar associação da Lf e Quercetina por método espectrofluorométrico;
- ✓ Avaliar a estabilidade e atividade da lactoferrina purificada por método espectrofluorométrico.
- ✓ Avaliar o comportamento eletroquímico da lactoferrina utilizando a técnica de voltametria cíclica e pulso diferencial
- ✓ Construir eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono
- ✓ Construir eletrodo de ouro modificado com dendrímero PAMAM-2G
- ✓ Construir curvas de calibração para a lactoferrina utilizando sensor de Au/PAMAM
- ✓ Determinar a concentração de lactoferrina em amostras de leite bovino, bubalino e caprino por métodos eletroquímico e espectrofluorométrico;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do leite

Foi feito um planejamento para coleta de amostras de leite. A seleção dos animais se deu de forma casual. A obtenção do leite era realizada mecanicamente e o mesmo resfriado imediatamente.

A amostra de leite bubalina utilizada neste trabalho foi doada pela empresa Buffalo Bill (São Luiz do Quitunde, Alagoas) com predominância da raça Murrah da Fazenda Castanha Grande, leite de cabra foi doado pela empresa Mutum (Satuba Alagoas), e o leite bovino pela empresa Ducamp (Maceió-Alagoas).

Os recipientes para coleta foram esterilizados, e inseridos dentro de um frasco de 2 litros. Alguns procedimentos foram realizados para manter as condições ideais da amostra, após a coleta das amostras de leite nos respectivos fornecedores foram armazenadas e acondicionadas em temperatura de 4°C até ser congelado no freezer para posterior processamento.

Todas as amostras de leite cru (in natura e resfriado) foram identificadas, colocadas em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas imediatamente ao laboratório para processamento.

4.2. Processamento do Leite

Inicialmente foi realizado o processamento do leite de búfalo 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 ocorre a subdivisão do processamento para o soro ácido em dois processos distintos: o processamento do soro ácido para a purificação por cromatografia e o processamento do soro ácido para isolamento pelo ponto isoelétrico da lactoferrina.

4.3. Precipitação salina (*Salting out*)

Após a separação das proteínas mediu-se o volume da amostra para adição de sulfato de amônio de acordo com a **Tabela 4**:

Tabela 4 Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína

Concentração inicial de Sulfato de Amônia	Saturação Percentual em 0																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Sulfato de amônia sólido (gramas) para ser adicionado a 1 litro de solução																
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: Wenk, 2007

Foi adicionado sulfato de amônio em quantidade proporcional ao fracionamento de 0-20%, 20-40%, 40-60%, 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 20 minutos a amostra foi centrifugada a 7.000 r.p.m. e temperatura de 4°C. O precipitado foi diluído em tampão de suspensão e o sobrenadante (fração 80-100%) foi armazenado. A amostra de 0-80% foi submetida novamente ao mesmo procedimento para um fracionamento subsequente de 0-40%. No sobrenadante adicionou-se sal novamente para adquirir a fração 40-80% e o sobrenadante coletado 80-100%. A fração 0-40% foi inserida na membrana de diálise, a amostra foi dialisada em 2 litros de tampão de suspensão. O tampão foi trocado três vezes a cada 3 horas e a última troca foi mantido overnight

4.4. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína foi determinada segundo 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 duas filtrações 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 concentração de 5µg/100µL à 55µg/100µL. Adicionou-se 2500µL de reagente de Bradford em cubeta de 3 mL, seguido de 100µL de solução padrão de albumina, incubando por 5 minutos. A leitura de absorbância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro, utilizando 100 µL água em lugar de solução padrão para referência.

4.5. Purificação por Cromatografia de filtração em gel (sephacryl s-100)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina sephacryl S-100 e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL, nas dimensões de 60x1 cm conectado a um sistema AKTA PURE (GE). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.70, 2M a uma taxa de fluxo de 0,009 mL/min.

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, dando início à cromatografia onde foram coletados 2 mL por fração. Das frações foram avaliadas a presença de proteína pela absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm.

Durante a cromatografia, a proteína nos eluentes foi monitorado por absorção ultravioleta a 280 nm com um espectrofotômetro UV II (ATTO, Tóquio, Japão). A

concentração de lactoferrina nas frações foi determinado multiplicando o valor de A_{280nm} por um fator.

4.6. Estudo Fluorimétrico

Segundo (CHEN et al., 2006) após a dosagem das proteínas foram feitas diluições das amostras em tampão Tris-HCl pH 7,30 a fim de padronizar a concentração. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl, a concentração de Lf foi de $1,21 \times 10^{-5}$ mol / L. Em uma célula de quartzo de 1,0 cm, foram adicionadas soluções Lf e Tris-HCl para formar 2,5 ml, respectivamente, e o intervalo da solução do fármaco foi gradualmente titulado na célula usando micro-injetor. O volume acumulado foi menor que 200 μ L. Sob a condição do aparelho, tanto da largura da fenda de entrada quanto de saída de 5 nm e velocidade de varredura de 240 nm / min, os espectros de extinção por fluorescência e os espectros de fluorescência síncronos foram obtidos. Em seguida, as medidas foram realizadas utilizando-se de métodos fotométricos com os parâmetros de intensidade no comprimento de onda $\lambda_{exc} = 290$ nm onde a lactoferrina apresenta seu pico em 340 nm. As medidas foram realizadas em triplicata em um fluorímetro de marca Shimadzu RF 5301PC na faixa de 300 nm-550 nm.

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 mol L⁻¹ (0,01 mol.L⁻¹ 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 mol.L⁻¹ (0,01 mol.L⁻¹ 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 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.

4.6.1. Estudos de fluorescência para a interação entre bLf e quantum dots CdSe-CdS(QD)

O processo de extinção da fluorescência, ou quenching, se refere a qualquer processo gerado por um agente externo (quencher) que reduza a intensidade da fluorescência. O efeito ocorre devido a vários tipos de interação entre o corante fluorescente em seu estado excitado e um supressor da fluorescência. O quenching pode ocorrer através de diferentes mecanismos como rearranjos moleculares, transferência de energia ou formação de complexos não fluorescentes. Esses processos podem estar relacionados a dois tipos básicos, denominados por quenching estático e quenching colisional, que também recebe a denominação de quenching dinâmico.

O quenching dinâmico ocorre quando o corante fluorescente em seu estado excitado entra em contato com outra molécula (quencher) na solução e decai para seu estado fundamental através de um processo não radiativo. Este processo não altera quimicamente as moléculas e é descrito pela equação de Stern-Volmer na forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_d [Q]$$

Equação 1

Assim, para esse experimento foi utilizada a concentração de Lf foi de $1,21 \times 10^{-5}$ mol/L. Com a adição de QDs, as concentrações finais de quantum dots CdSe-CdS (QD) nas amostras foram alteradas para 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 4,0, 4,5 e 5,0 10^{-6} mol / L para CdS-CdSe (QD). As larguras das fendas de excitação e emissão foram fixadas em 5 nm. Além disso, 80 nm foi definido como comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão foi obtido de 290 a 460 nm. O experimento foi operado em três temperaturas diferentes (25°C, 30°C e 35°C). O intervalo varrido dos espectros de fluorescência síncrona foi de 200 a 360 nm. Para os espectros de fluorescência, os comprimentos de onda de emissão e excitação foram obtidos de 200 a 500 nm e 200 a 350 nm com incrementos de 5 nm, respectivamente. Os dados pós-coleta foram processados com o programa Origin.

Eles são geralmente analisados de acordo com a equação de Stern – Volmer da seguinte forma (SUETSUNA, 2004):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

Equação 2

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença de ligante, $[Q]$, K_{SV} , K_q e τ_0 são a concentração do ligante, constante de extinção de Stern-Volmer, constante de taxa de extinção e tempo médio de vida da biomolécula sem ligante ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), respectivamente (TSURI, 2003).

4.6.2. Estudos para interação da lactoferrina e quercetina

Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro 2,5 mL de solução lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na concentração de 2,5mM em células de quartzo de 1,0 cm foi titulado por adições sucessivas de 2,5 mM Quercetina (QCT) soluções para concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 μ M, respectivamente, e seus espectros de absorção foram registrados a partir de 200 a 500 nm.

4.7. Estudo Eletroquímico

Para determinação de lactoferrina também foram utilizadas técnicas eletroquímicas. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab® em um sistema constituído por três eletrodos como pode ser observado na figura 11. Como eletrodo de trabalho utilizou-se o eletrodo de ouro modificado, como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e como eletrodo de referência foi utilizado o sistema $Ag|AgCl|Cl^-$ (saturado). Os métodos eletroquímicos selecionados nesse estudo foram a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial.

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ C$) em tampão fosfato 0,1 N pH = 7,3 com adições de 10 μ L da solução estoque de lactoferrina com concentração de $1,21 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, antes de cada varredura, os sistemas foram submetidos à agitação e desaeração com gás inerte de N₂ por um período de 2 minutos. Para determinação da lactoferrina em amostra real também foram utilizados os mesmos parâmetros com adições de 100 μ L do sobrenadante do leite bovino na faixa de +0,0 V a +0,4 V, para o do sobrenadante do leite bubalino foram feitas adições de 100 μ L na faixa de +0,0 V a +0,6 V.

Montou-se o sistema eletroquímico em cela com 10 mL de tampão fosfato pH 7,0 e introduziu-se os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. No equipamento AUTOLAB, escolheu-se o método de voltametria de pulso diferencial (VPD) e os parâmetros eletroquímicos foram ajustados (Figura 11).

Figura 11. Cella Eletroquímica contendo os eletrodos (trabalho, auxiliar e referência)



Fonte: Andrade, 2013.

4.7.1. Modificação do eletrodo (carbono vítreo com Nanotubos de carbono e ouro modificado com PAMAM)

Para os experimentos com eletrodo de carbono vítreo, era realizada previamente a limpeza de acordo com as seguintes etapas: limpeza de modo mecânico, ou seja, polindo a superfície do mesmo empregando alumina com dimensão de $0,3\ \mu\text{m}$ em uma lixa de polimento de veludo, logo após, lavado com água ultrapura em abundância, deixado por cerca de 30s em banho ultrassom imerso em etanol com grau analítico de pureza, lavado mais uma vez em água ultrapura e por fim esperava-se a secagem. Seguindo esses processos, ainda era feita uma observação do comportamento do mesmo eletrodo em uma solução de ferri/ferrocianeto de potássio (1 mM cada) em KCl 0,1 M, a fim de verificar a área eletroativa do eletrodo e ainda se o polimento desse eletrodo está adequado, observando-se a diferença do potencial dos picos

de oxidação e redução. Sendo assim, tendo como base esses pontos, o eletrodo estava apto para realização das medidas eletroquímicas ou ainda para inserção dos elementos modificadores

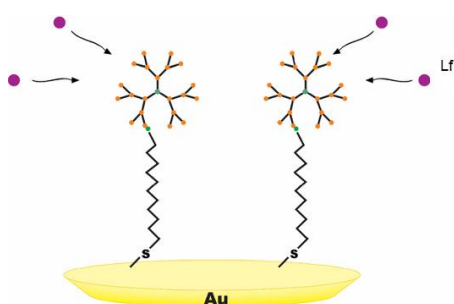
Para as modificações do eletrodo de carbono vítreo que envolveram nanotubos de carbono de paredes múltiplas, as modificações foram realizadas de acordo com os seguintes passos: era colocada a dispersão de 1 μL em 1 μL até completar 10 μL final na superfície do eletrodo, porém, durante cada adição, o eletrodo era levado para estufa, no qual era colocado para secagem por 10 minutos à 60 °C. Após isso, aguardava-se cerca de 5 minutos para atingir a temperatura ambiente e então o eletrodo estava pronto para serem feitas as medidas

Também se preparou um eletrodo de ouro modificado com PAMAM e Ácido-11-mercaptoundecanóico (MUA) com a finalidade de melhorar o processo de transferência de elétrons (CANDIDO, 2018). O eletrodo de ouro foi limpo por aquecimento em uma chama de gás oxigênio em seguida imerso em clorofórmio para evitar a oxidação da superfície do eletrodo. A modificação de eletrodo com PAMAM G2 foi realizado em duas etapas.

Na superfícies do eletrodo foram funcionalizadas por meio de monocamadas ligadas a tiol do ácido-11-mercaptoundecanóico (MUA), imergindo-os em uma solução metanólica de MUA a $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ a 25 °C por 24 h. Durante a etapa 2, os dendrímeros PAMAM foram ligados quimicamente a superfície do eletrodo pela imersão dos substratos de ouro tiolado em soluções metanólicas contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC) e $21 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ do dendrímero PAMAM G2 por 12 horas a 25 °C como pode ser visto da figura 12. O eletrodo de ouro é funcionalizado, promovendo a criação de ligações de amida entre as extremidades COOH do MUA e dos grupos amina (CANDIDO, 2018).

A análise por voltametria cíclica para a superfície do eletrodo foi realizada em tampão fosfato pH 7,30 com $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ de ferroceno carboxílico

Figura 12. Representação esquemática do processo de modificação da superfície do eletrodo de ouro com PAMAM 2G.



Fonte: Candido, 2018

4.8.Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras purificadas foram submetidas a PAGE para verificar a presença de bandas correspondentes à proteína de interesse (Lactoferrina). O extrato foi preparado utilizando tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 8).

As condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada usando gel de acrilamida de 12% como descrito por Laemmli (1970). As amostras foram preparadas em concentrações apropriadas usando o tampão de amostra pronto para uso e aqueceu a mistura por 5 a 7 minutos a 100 ° C e quando carregado nos poços da cuba, correu a temperatura ambiente a 90mV por 160min.

Para detecção das bandas correspondentes as proteínas, o gel do SDS-PAGE foi corado com Azul de Comassie (CCB, Comassie Brilliant Blue R-250) overnight e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético). Os pesos moleculares das proteínas foram estimados em comparação com bandas produzidas pelo marcador (V5491, Promega).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização da Lactoferrina Bupalino

Inicialmente, foi realizada a caracterização da proteína lactoferrina bupalino presente no leite em busca de compreender as características da proteína, bem como seu isolamento e purificação de modo que resultasse em maior concentração e fração da proteína em estudo.

5.2. Processamento do leite bupalino

No processamento de 490 mL de leite bupalino, obtemos uma massa de gordura 41,806 g, um volume de leite desnatado de 440 mL, a massa de caseína de 52,104 g, o volume de soro ácido de 380 mL, 14,683 g do precipitado e o volume de soro neutralizado de 350 mL (**Tabela 5**).

Tabela 5. 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: Silva, 2021.

5.3. PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO

5.3.1. Precipitação Salina (*Salting Out*)

A amostra (ppt) final da etapa de separação das proteínas, descrita anteriormente foi submetido a quatro precipitações salina com sulfato de amônio, como método adotado para aumentar a eficiência da cromatografia líquida, melhorando o fator de purificação da proteína,

pois é um método de solubilidade simples e de baixo custo para a purificação. Nesta etapa fez-se necessário o controle do tempo, agitação lenta e temperatura para todos os fracionamentos do processo. A Tabela 6 mostra os fracionamentos de 0-20%, seguido de 20-40%, 40-60% e 60-80%. Sendo assim, possível verificar as concentrações de proteína presente em cada fração da amostra

Tabela 6:Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de 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

* 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

Com as amostras resultante do fracionamento pelo processo de *salting out*, foi possível analisar o espectro fluorimétrico e determinar em qual fração existia a presença de uma maior

quantidade de lactoferrina, sendo assim escolhido o precipitado 20-40%, 40-60%, conforme a figura 13 mostrada a seguir. O alto valor de proteína obtido no sobrenadante 60-80% é devido a alta concentração de sal que interfere no método de Bradford

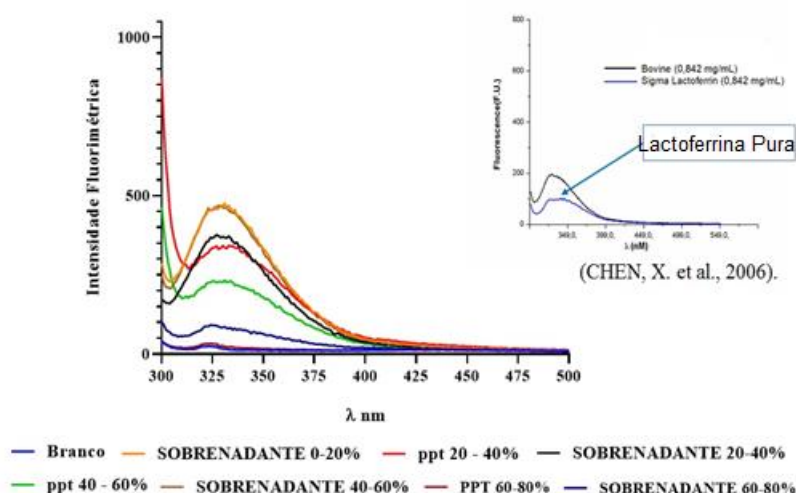


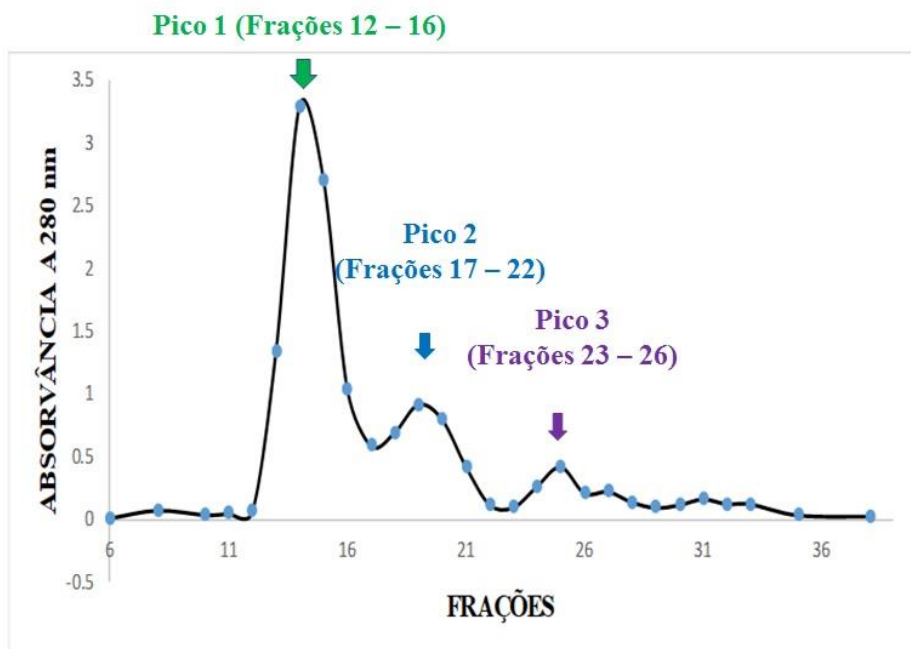
Figura 13: Espectros de fluorescência de lactoferrina de bubalino das frações salinas dos perfis de salting out (pH 7; 290nm).

Fonte: autor

Conforme observado os espectros de fluorescência de Lactoferrina de bubalino das frações salinas dos perfis de *salting out* e correlacionando com o gráfico produzido com a lactoferrina pura, pode-se determinar a presença BLf devido a presença do seu pico característico na faixa do comprimento de onda de 335-340nm, conforme observado por outros autores (CHEN, X. et al, 2006).

A **Figura 14** apresenta um perfil cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspensionado 40 – 60% (300µL) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.

Figura 14: Espectros de fluorescência da eluição das frações eluídas e reunidas dos 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

É possível observar que o perfil cromatográfico da absorvância a 280 nm de eluição do precipitado ressuspendido (40-60%) (300µL) 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 a 16, o pico 2 as frações dos tubos 17 a 22 e o pico 3 as frações dos tubos 23 a 26. Os três picos de estimativa de proteínas não possuem valores profundos obtendo uma purificação com eficiência parcial pela coluna cromatográfica Sephacryl S-100. A Sephacryl S-100 possui uma capacidade de purificação de 10 a 100 KDa e a lactoferrina possui um peso molecular cerca de 80 KDa. Desse modo, a Sephacryl S-100 estava trabalhando em seu limite de capacidade de purificação próximo de 100 KDa, sendo assim, obtendo uma purificação parcial da lactoferrina de bubalinos. Contudo, o ideal para a purificação da lactoferrina bubalina é uma coluna cromatográfica com uma faixa de capacidade de purificação mais alta como a Sephacryl S-200 que possui sua capacidade de purificação de proteínas em até 250 KDa.

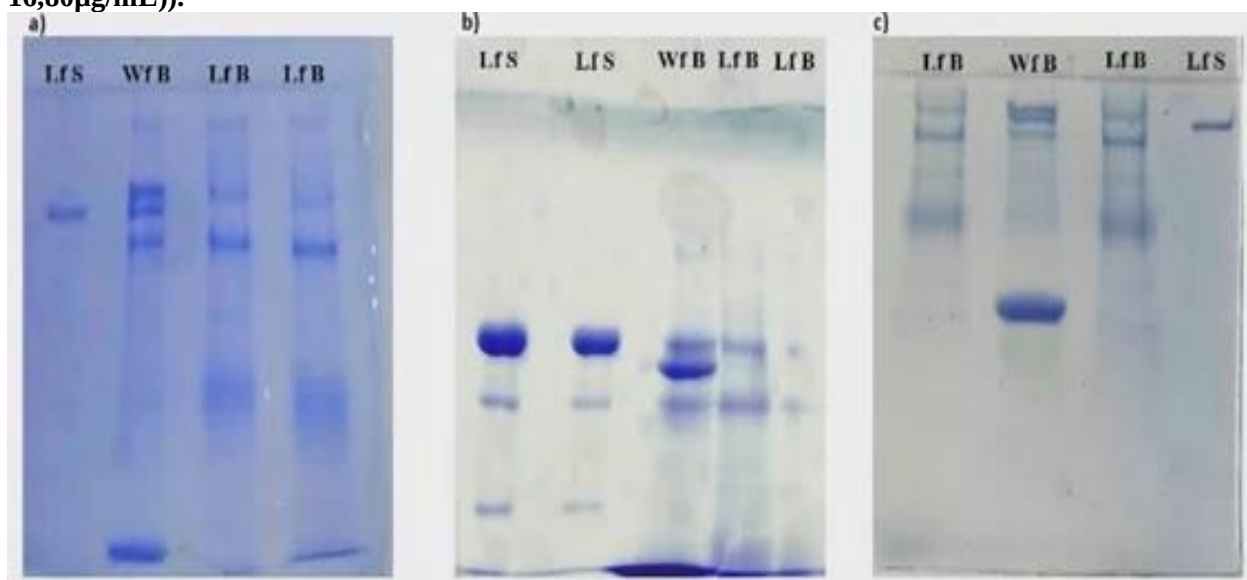
Um estudo realizado por Kim *et al.* (2009), purificou a lactoferrina de equinos da Mongólia por cromatografia de gel filtração Sephadex G-100, capacidade de purificação de 4

a 150 KDa, que resultou em 3 picos, sendo que, os 3 picos nesta purificação, a lactoferrina foi purificada no terceiro pico. Sharbafi *et al.* (2011), purificaram a lactoferrina do colostro de leite bovino usando CM-Sephadex C-50, uma cromatografia de troca catiônica, obtendo um pico forte entre 0,4 a 0,5 M e a banda única de Lf purificado foi observada em eletroforese SDS-PAGE com a concentração de Lf determinada pelo ensaio Bradford de cerca de 2,4 mg/ml.

5.3.2. Eletroforese SDS-PAGE

A amostra referente ao pico 1 (BLf) do protocolo de purificação foi aplicada em gel de eletroforese. A eletroforese SDS-PAGE de BLf1 com 13mg proteína aplicados na canaleta 2 mostra uma banda de aproximadamente 80 KDa (Figura 15).

Figura 15. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas por Sephacryl S-100:(a) gel SDS – PAGE de concentração 8%; (b) gel SDS – PAGE de concentração 10% e (c) gel SDS-PAGE de concentração 12% (LfS: lactoferrina comercial Sigma (13,42µg/mL; 15,10µg/mL), WfB: Soro neutro (5,10 µg/mL) e LfB: lactoferrina bubalina parcialmente purificada (14,40 µg/mL; 16,80µg/mL)).



5.4. Purificação isoeétrica pelo (pI) da lactoferrina

No processamento de purificação pelo isoeétrica um volume de 500 mL de leite bubalino, obtemos uma massa de gordura 34,658 g, um volume de leite desnatado de 420 mL, a massa de caseína de 121,6 g, o volume de soro ácido de 290 (Tabela 7).

Tabela 7. Balanço de massa do protocolo de isolamento da lactoferrina de búfalo pelo processo de purificação isoeletrica (pI).

Etapas do Processamento	Volume (mL)	Massa (g)
Leite de búfalo	500	-
Gordura do leite	-	34,658
Leite desnatado	420	-
Caseína	-	121,6
Soro acidificado	290	-

Fonte: Autor, 2021.

Na etapa da titulação do soro ácido com NaOH até o pH 5,2 foi obtido na primeira centrifugação 0,522 g de precipitado ressuspensionado em 300 µL de tampão e 48 mL de sobrenadante. Na segunda centrifugação obteve um precipitado com massa 0,805 g e um sobrenadante com volume de 43 mL. Na etapa da titulação do soro titulado com NaOH até o pH 8,3 foi obtido na primeira centrifugação um precipitado de 3,514 g ressuspensionado em 700 µL de tampão e 35 mL de sobrenadante. Na segunda centrifugação ao pH 8,3 obteve um precipitado de 1,763 g e um sobrenadante de 30 mL. A Tabela 8 mostra a concentração de proteínas das frações da titulação pelo ponto isoeletrico da lactoferrina.

Tabela 8. Concentração de proteínas nos perfis do ponto isoeletrico do isolamento da lactoferrina.

Amostras	Volume (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Concentração de proteínas (g)
1ª Sobrenadante à pH 5,2	48	5,35	0,416
1ª Precipitado ressuspensionado à pH 5,2*	0,104	5,05	0,005
2ª Sobrenadante à pH 5,2	43	4,08	0,175
2ª precipitado ressuspensionado à pH 5,2	0,106	5,73	0,009

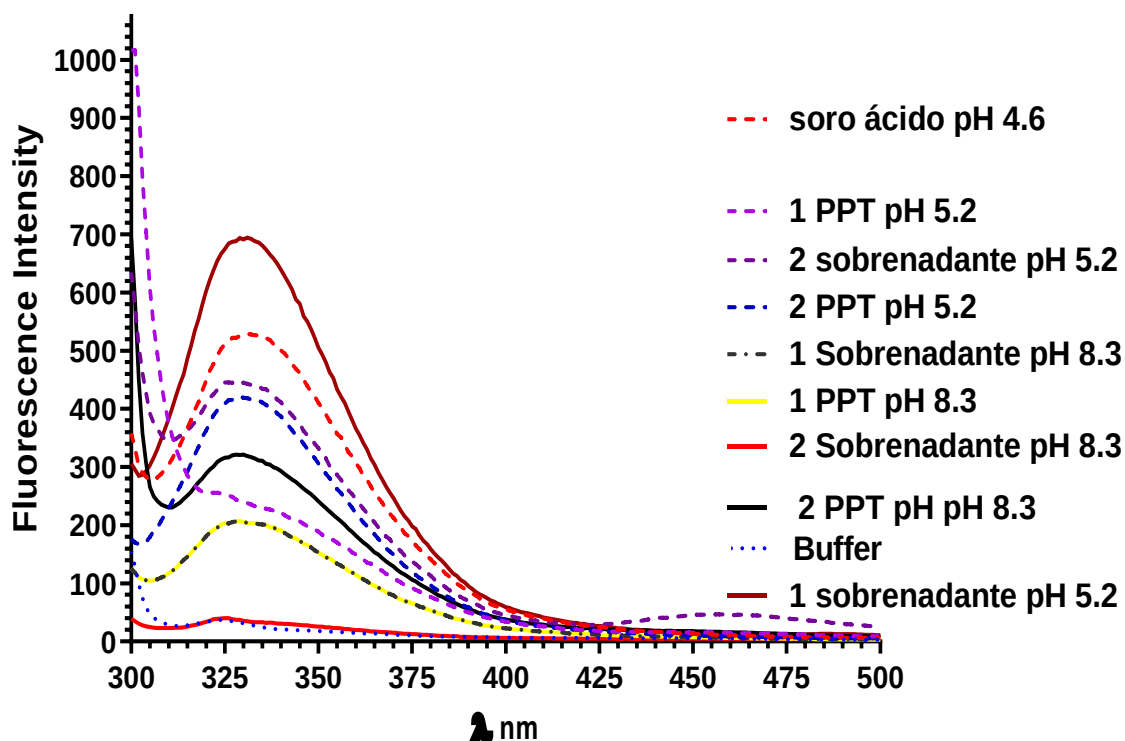
1ª Sobrenadante à pH 8,3	35	4,63	0,162
1ª Precipitado ressuspensionado à pH 8,3*	1,700	22,16	0,037
2ª Sobrenadante à pH 8,3	30	4,51	0,135
2ª precipitado ressuspensionado à pH 8,3	0,750	3,54	0,002

* 1500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7.

Fonte: Autor, 2021.

A Figura 16 mostra o espectro de extinção de fluorescência dos perfis de purificação isoeletrica pelo pI da lactoferrina bubalina. Baseando-se no estudo Chen et al. (2006) o precipitado ressuspensionado obtido na segunda centrifugação no pH 8,3 na concentração 0,842 mg/mL apresentou o espectro de extinção de fluorescência de intensidade fluorimétrica 332 nm característico o espectro de fluorescência da lactoferrina Bovina Sigma (Sigma, USA). O espectro de fluorescência do segundo precipitado ressuspensionado a pH 8,3 foi similar no estudo de Chen et al. (2006). Segundo Steijns e Van Hooijdonk, (2000), os valores teóricos de pI calculados para lactoferrina bovina e humana são 9,4 e 9,5, respectivamente; no entanto, os valores experimentais relatados podem divergir muito. Dependendo do método usado para a separação de lactoferrina, os valores em torno de 8 foram relatados para a lactoferrina bovina, enquanto uma ampla faixa de pI 5,5 a 10 foi relatada para a lactoferrina humana. Esta variação pode ser devido a variações no N-terminal rico em arginina da molécula devido às condições de separação.

Figura 16. Espectros de fluorescência dos perfis da titulação do soro ácido no isolamento da Lf pelo pI.

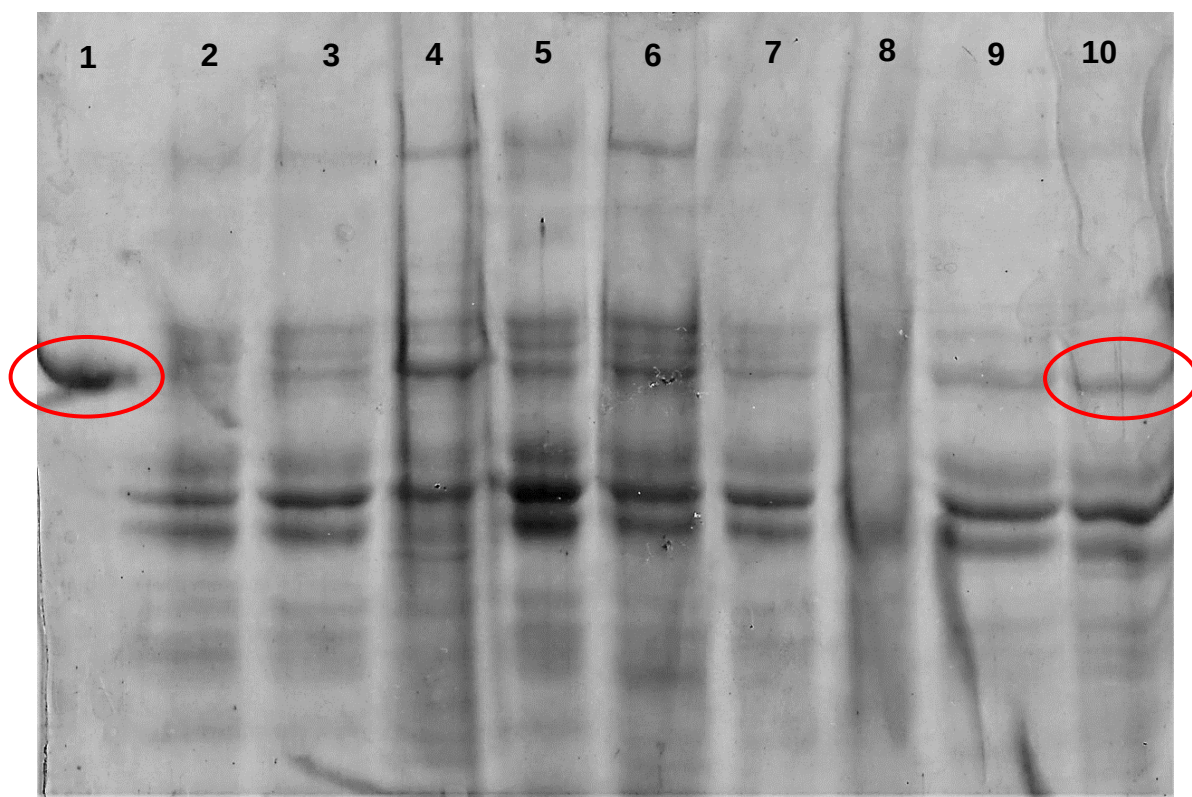


Fonte: Autor, 2021.

A Figura 17 apresenta o estudo eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de concentração 10% em condições redutoras dos perfis de purificação isoeletrica pelo pI da lactoferrina. foram aplicada as amostras no gel de eletroforese, onde a canaleta número (1) é referente a lactoferrina bovina Comercial (SIGMA, USA) com a concentração de 90 mg no poço, a canaleta 2 é o soro ácido à pH 4,6 na concentração 90 mg no poço, o número (3) é referente ao 1ª sobrenadante pH 5,2 com a concentração de 90 mg no poço, número (4) é referente ao 1ª precipitado ressuspensionado à pH 5,2 com a concentração de 90 mg no poço, número (5) é referente ao 2ª sobrenadante à pH 5,2 com a concentração de 90 mg no poço, número (6) é referente ao 2ª precipitado ressuspensionado à pH 5,2 com a concentração de 90 mg no poço, número (7) é referente ao 1ª sobrenadante à pH 8,3 com a concentração de 90 mg no poço, número (8) é referente ao 1ª precipitado ressuspensionado à pH 8,3 com a concentração de 90 mg no poço, número (9) é referente ao 2ª sobrenadante à pH 8,3 com a concentração de 90 mg no poço e número (10) é referente ao 2ª precipitado ressuspensionado à pH 8,3 com a concentração de 90 mg no poço. Foram aplicadas no gel de eletroforeses SDS-PAGE iguais as

concentrações de amostras de 90 mg no poço. No poço (1) foi adicionada à Lactoferrina bovina SIGMA (82 KDa) essa amostra foi considerada como padrão de peso molecular.

Figura 17. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação pelo pI gel SDS – PAGE de concentração 10%. A amostra (1) lactoferrina bovina comercial (SIGMA, USA) (90 µg), (2) soro ácido à pH 4.6 (90 µg), (3): 1ª sobrenadante à pH 5,2 (90 µg), (4): 1ª precipitado ressuscitado à pH 5,2 (90 µg), (5): 2ª sobrenadante à pH5,2 (90 µg), (6): 2ª precipitado ressuscitado à pH 5,2 (90 µg), (7): 1ª sobrenadante à pH 8,3 (90 µg), (8): 1ª precipitado ressuscitado à pH 8,3 (90 µg), (9): 2ª sobrenadante à pH 8,3 (90 µg) e (10): 2ª precipitado ressuscitado à pH 8,3 (90 µg).



É possível observar na canaleta (1), Lactoferrina Bovina Comercial (SIGMA, USA), a presença de uma banda de proteínas, na canaleta (2), soro ácido à pH 4.6 (extrato bruto), é possível visualizar a presença de várias bandas onde todas as proteínas do soro estão presentes nessa amostra. Quando comparamos a canaleta (10) com a canaleta (2) é possível determinar que não ocorreu purificação.

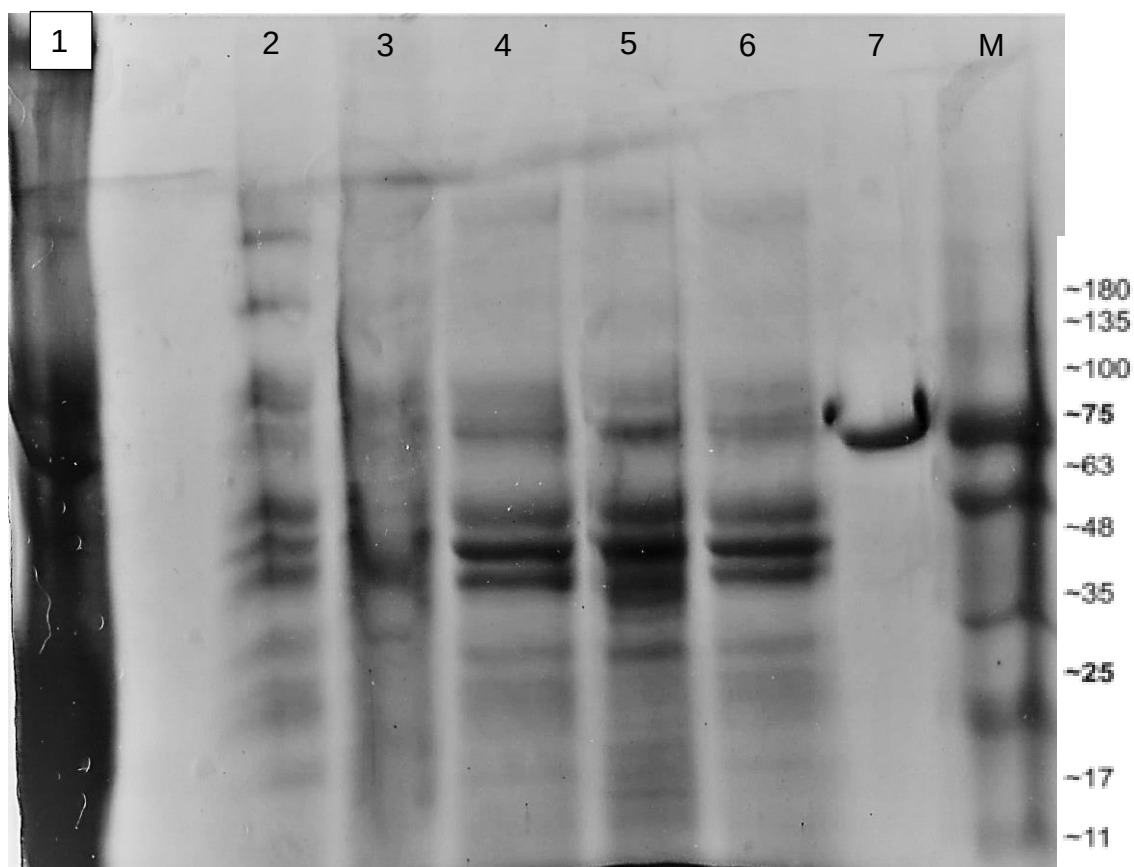
É possível observar na canaleta (8), 1º precipitado ressuscitado pH 8,3 na canaleta (1), lactoferrina Bovina Comercial (SIGMA), mas nas canaletas (7), (9) e (10) a banda referente a

lactoferrina estão presentes. Quando comparadas as canaletas (1), (8) e (10) observa-se que a lactoferrina de bubalinos purificou na segunda centrifugação em seu ponto isoelétrico (pI). Logo, a lactoferrina bubalina foi purificada em seu ponto Isoelétrico que varia de 8,0 – 8,5.

Na figura 18, é possível observar o gel de eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e concentração a 10%. dos perfis de purificação isoelétrica pelo pI da lactoferrina. Foram aplicadas as amostras no gel de eletroforese, onde a canaleta número (1) é referente a Leite de bubalinos com a concentração de 90 µg no poço, canaleta número (2) é referente a soro ácido à pH 4,6 com a concentração de 90 µg no poço, canaleta número (3) é referente a 1ª precipitado ressuscitado a pH 8,3, com a concentração de 90 µg no poço, seguido pelo número (4) é referente ao 1ª sobrenadante à pH 8,3 com a concentração de 90 µg no poço, o número (5) é referente ao 2ª precipitado ressuscitado à pH 8,3 com a concentração de 90 µg no poço, o número (6) é referente ao sobrenadante à pH 8,3 com a concentração de 90 µg no poço, o poço (7) é referente a lactoferrina bovina Comercial (SIGMA, USA) com a concentração de 90 µg no poço e a canaleta (M) marcado de peso molecular.

É possível observar quando comparado a canaleta (5) com a canaleta 7 e o marcador de peso molecular é possível identificar a presença de uma banda na canaleta 7, referente a lactoferrina comercial com o peso molecular de acordo com o Marcador tem o peso molecular em superior a 75 KDa a mesma banda foi observada na canaleta 5, o 2ª precipitado ressuscitado pH 8.3. Portanto, a Lactoferrina foi purificada parcialmente no pH 8.3 a partir da segunda centrifugação e possui o peso molecular superior a 75 KDa.

Figura 18. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação isoelétrica pelo pI de lactoferrina gel SDS – PAGE de concentração 10%. A amostra (1) leite bubalino (90 µg), (2) soro ácido à pH 4.6 (90 µg), (3): 1ª precipitado ressuscitado à pH 8.3 (90 µg), (4): 1ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (5): 2ª precipitado ressuscitado à pH 8.3 (90 µg), (6): 2ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (7) lactoferrina bovina comercial (SIGMA, USA) (90 µg) e (M): marcador de peso molecular.



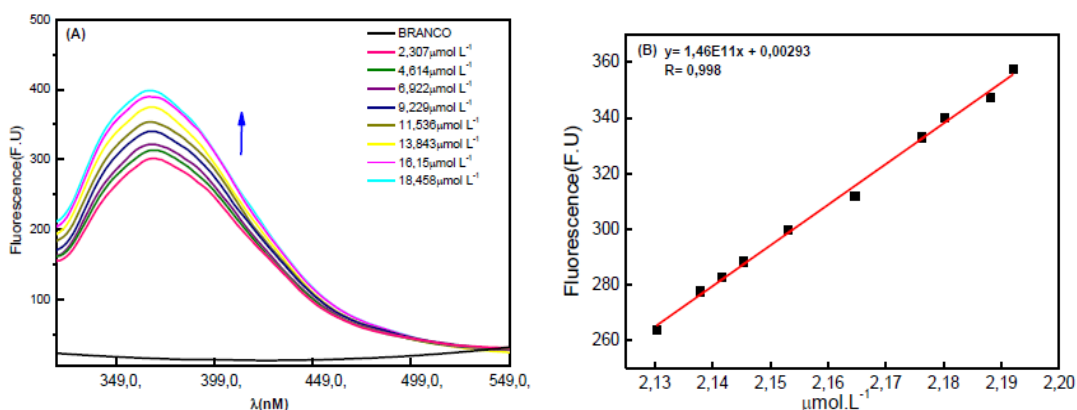
Fonte: Autor, 2022.

5.5. Determinação da Lactoferrina por Espectrofluorometria

Analizando os espectros de emissão de fluorescência da lactoferrina pura no estudo realizado por Yoshida et al, 2010, é possível observar que a lactoferrina apresentou uma banda larga e intensa, centrada em 340 nm quando excitada em 290 nm. O aumento da concentração de lactoferrina no meio promoveu um aumento na intensidade dessa banda, como mostra a Figura 18.

A partir deste estudo, foi possível construir uma curva analítica usando a técnica pela qual foi possível detectar lactoferrina com a concentração de $1,21 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ da amostra padrão de Lactoferrin Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) como podemos ver na Figura B, que apresentou uma boa linearidade de acordo com a correlação dos pontos de $R = 0,998$.

Figura 18: A) Curva de fluorescência da amostra padrão de lactoferrina Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) em tampão Tris-HCl pH 7,30 na faixa de 300nm-550nm λ_{exc} = 290nm B) Curva de intensidade de fluorescência em função da concentração. N=10



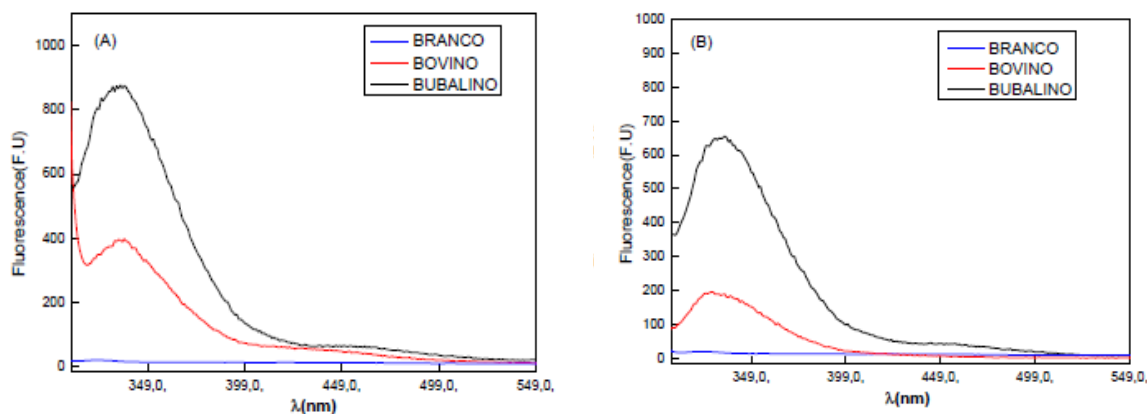
Com o processo de separação das proteínas do leite de diferentes espécies (bubalino, bovino e caprino) possibilitou comparar o espectro de fluorescência, e determinar a concentração de lactoferrina em diferentes espécies.

Após a medição das proteínas, foram realizadas diluições das amostras em tampão Tris-HCl pH 7,30 para padronizar as concentrações totais de proteínas, utilizando métodos fotométricos. Nas condições experimentais deste trabalho, ambas as amostras apresentaram uma banda larga e intensa, centrada em 340 nm, quando excitada em 290 nm. Isso confirma a presença de lactoferrina na amostra, conforme ilustrado nas figuras 19A e B (CHEN et al., 2006, REZENDE, 2019)

Conforme apresentado na figura 19, é possível afirmar que a espécie de bubalinos apresenta uma maior concentração da proteína lactoferrina presente nas amostras analisadas.

Seguindo outros estudos realizados por Chauhan,, et al 2021a concentração de lactoferrina no leite varia muito entre as espécies, onde é possível confirmar em experimentos realizados nesse trabalho. Por exemplo, o leite humano e o leite de outros primatas, porcos e camundongos são ricos em lactoferrina, enquanto o leite de espécies como a vaca e outros ruminantes é muito baixo em lactoferrina. Espécies que apresentam baixas concentrações de lactoferrina no leite geralmente apresentam níveis mais altos de transferrina no leite, enquanto espécies como o humano têm pouquíssima transferrina no leite. Assim, a maioria das espécies parece secretar uma proteína do tipo transferrina ou lactoferrina no leite.

Figura 19: A) Comparação entre a fluorescência no leite de duas espécies em tampão Tris-HCl pH 7,3 na faixa de 300nm-550nm. $\lambda_{exc} = 290nm$. B) Comparação entre fluorescências no sobrenadante do leite das duas espécies em tampão Tris-HCl pH 7,3 na faixa de 300nm-550nm $\lambda_{exc} = 290nm$

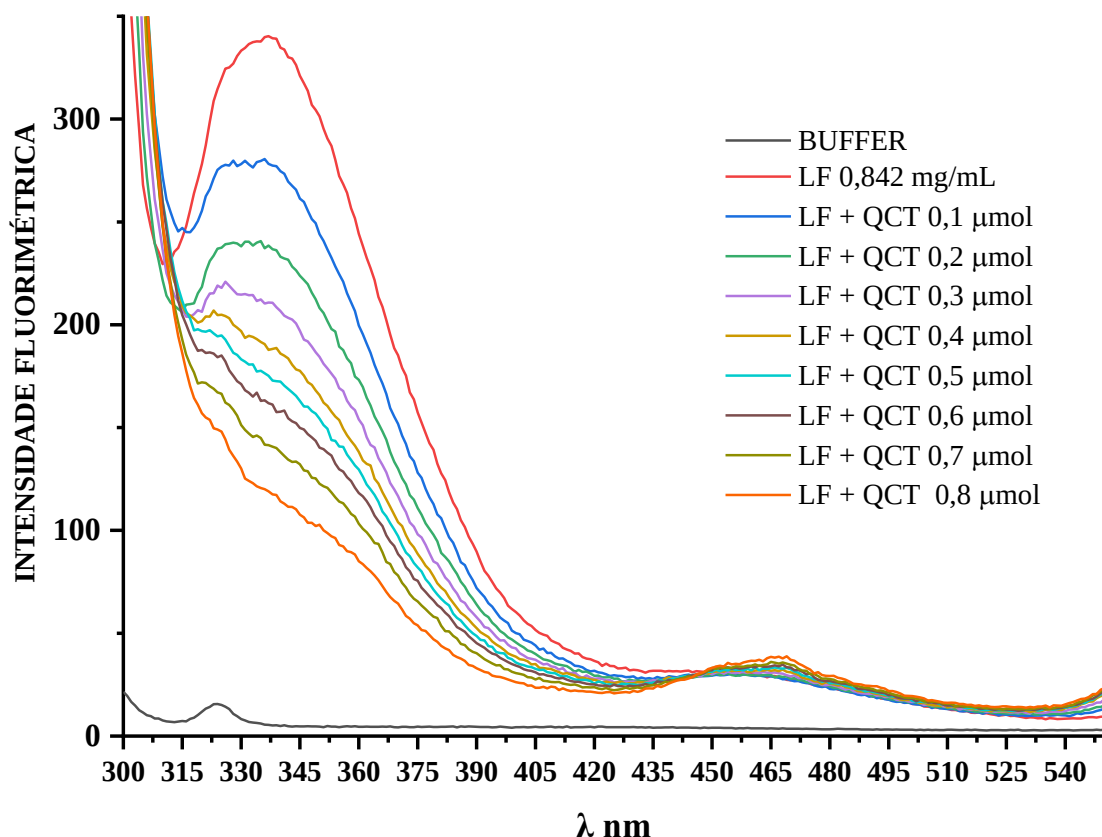


5.6.INTERAÇÃO ENTRE LACTOFERRINA E QUERCETINA

Os estudos fluorimétricos utilizando o fármaco quercetina foram medidos para explorar a mudança estrutural de Lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada com a adição de quercetina (QCT).

Na **Figura 20** é possível observar a complexidade da quercetina com a lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada, de modo que ocorrem alterações nos comprimentos de ondas de absorbâncias máximas de lactoferrina de bubalinos com a presença de antibiótico amoxicilina ($1 \text{ a } 8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), ou seja, ocorrendo o deslocamento hipsocrômico no primeiro pico de da lactoferrina na presença de QCT ($1 \text{ a } 8 \text{ } \mu\text{M}$). Podemos visualizar o efeito hipercrômico com o aumento da concentração de QCT resultando no aumento da absorbância. Assim, os espectros UV-vis de absorção revelaram que as posições de pico máximo dos complexos tiveram uma revelação que as posições de pico máximo dos complexos tiveram um desvio para o azul de 268,68 nm para 265 nm. Os resultados sugeriu que a quercetina alterou significativamente a polaridade em torno do aumento de 1 para 8 μM . Simultaneamente, com o aumento da concentração de QCT ($1 \text{ a } 8 \text{ } \mu\text{M}$) na lactoferrina bubalina parcialmente purificada, podemos observar a presença de um novo pico em 376 nm que é o pico característico da quercetina um efeito hipercrômico.

Figura 20 Estudo espectrofluorimétrico de interação da lactoferrina e quercetina



fonte: autor e colaboradores 2021

Um estudo realizado com três flavonoides que investigou a interação entre os flavonóides Luteolina (LTL), Quercetina (QCT) e Naringenina (NGN) com a lactoferrina bovina. Observou-se que os valores de pico aumentaram gradualmente, sugerindo que as interações entre três flavonóides e BLF ocorreram, principalmente induzidas por ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica. Além disso, a adição dos flavonóides resultou na presença de um novo pico em 370 nm, que é o pico característico dos flavonóides, e os valores de absorção dos flavonóides aumentaram com o aumento da concentração de flavonóides, o que confirmou ainda mais a ocorrência de interações entre três flavonóides e BLF (HUANG *et al.*, 2018).

Com a inserção dos carreadores de fármacos a indústria farmacêutica conseguiu desenvolver, por exemplo, fármacos com liberação controlada, formulação que apresenta inúmeras vantagens em comparação a outras com liberação convencional, podendo assegurar

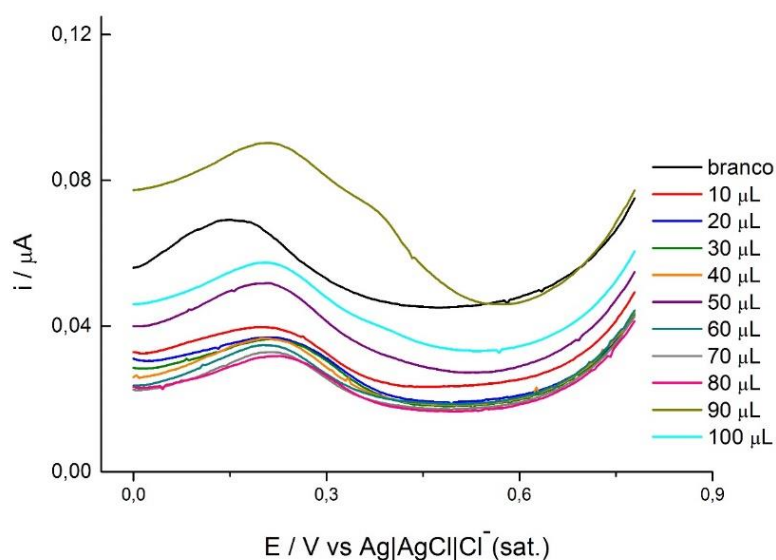
aos fármacos maior estabilidade, diminuição considerável da toxicidade com um maior controle das concentrações plasmáticas, possibilita o direcionamento a sítios de ação específicos, diminuição da dose e frequência de administração dos fármacos, dentre outros pontos. A lactoferrina pode dessa forma agir como carreador ou ainda unir ação profilática dessa proteína promissora com ação terapêutica da Quercetina potencializar os efeitos terapêuticos do fármaco.

5.7. Determinação de Lactoferrina por eletroquímica

5.7.1. Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de Carbono

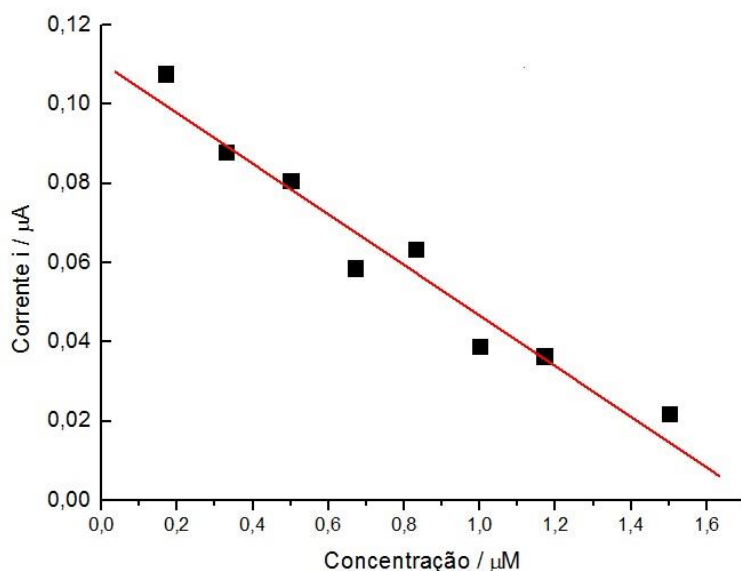
Os ensaios eletroquímicos com imobilização de lactoferrina com nanotubos de carbono de paredes múltiplas em eletrodo de carbono vítreo e demonstraram nos experimentos de voltametria de pulso diferencial, Figura 21, um sinal de oxidação em +200mV entretanto o pico não aumenta linearmente com a as adições sucessivas de lactoferrina demonstrando pouca afinidade com a proteína

Figura 21 Resposta VPD em ECV/NTC/ para adições sucessivas de BLf em tampão fosfato pH 7.



É possível observar nas amostras proteicas mais complexas do soro do leite, amostras que não passaram por cromatografia, o sinal de lactoferrina aparece em aproximadamente +200mV.

Figura 22: Curva analítica BLf/mmol/L vs Corrente μA em ECV/NTC.



Entretanto a curva analítica apresentou valores de corrente que decresceram com o aumento da concentração, expressando que a concentração não pode ser determinada quantitativamente, mas qualitativamente sim.

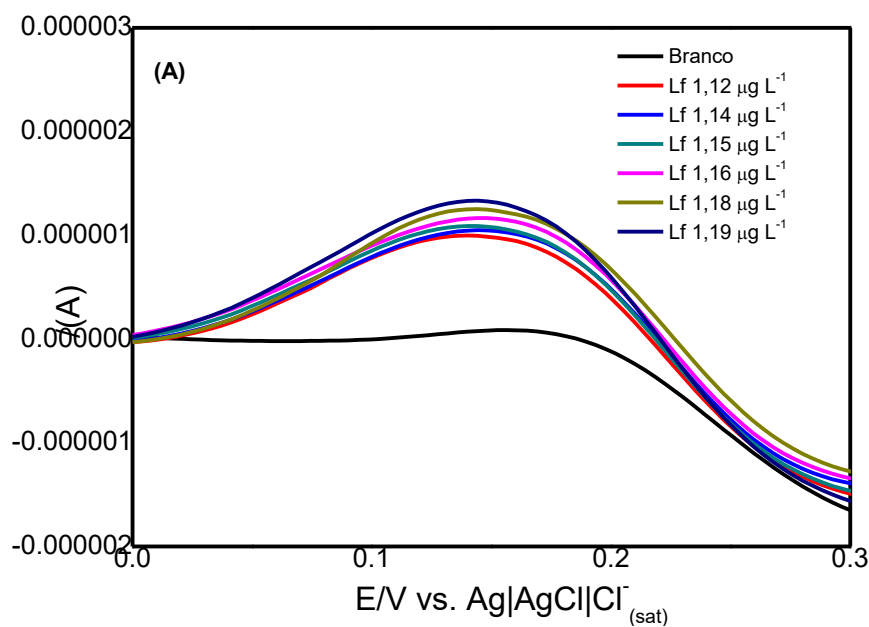
5.7.2. Eletrodo de Au modificado com PAMAM

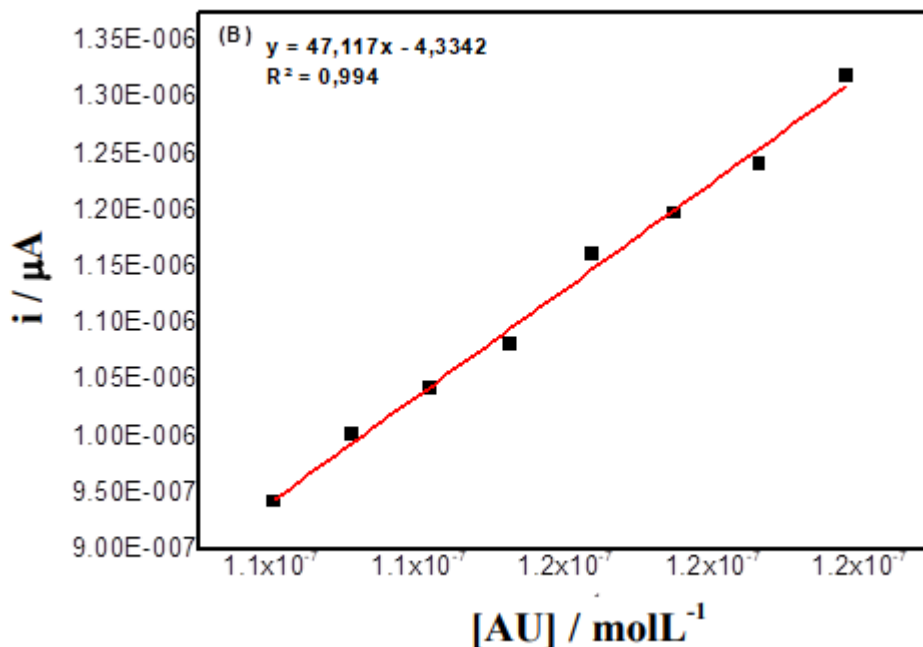
Estudos eletroquímicos com lactoferrina foram testados, utilizando eletrodo de ouro modificado com dendrímero PAMAM-2D por diferentes voltametrias (VC e DPV). As análises foram realizadas em meio prótico em tampão fosfato, pH 7,3. Na literatura, não existem estudos eletroquímicos da lactoferrina, preferindo trabalhar com a menor concentração determinada por fluorescência ($1,21 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Análises de voltametria de pulso diferencial foram realizadas para avaliar qualitativa / quantitativamente o comportamento da proteína. Através de estudos iniciais, o intervalo foi limitado a 0,0 V a + 0,3 V para amostras de lactoferrina sintética e para o sobrenadante de leite de vaca. Para o sobrenadante de leite de búfalo, o intervalo foi limitado de 0,0 V a +0,6 V. Isso aconteceu porque a presença do sinal analítico foi mantida nesse intervalo potencial.

Em eletrodo de ouro, observou-se um sinal muito discreto, entretanto usando o eletrodo de ouro modificado com PAMAM, com a adição de lactoferrina no meio eletrolítico, foi possível observar o aparecimento de um pico no potencial de +0,147 V relacionado a um

processo de oxidação redox, como podemos ver na Figura 23A. Com esse sensor houve uma facilidade de oxidação em torno de 500mV em relação ao eletrodo NTC. É possível correlacionar o aumento da concentração de lactoferrina com o aumento da corrente, o que indica uma sensibilidade aprimorada do eletrodo. A lactoferrina em meio prótico apresentou um sinal eletroquímico de +0,147 V correspondente ao processo de transferência de elétrons relacionado ao $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ presente em sua estrutura. A interação da lactoferrina com o PAMAM pode estar ocorrendo através do encapsulamento, portanto sua identificação com esse sensor é eficiente.

Figura 23: A) Curva de lactoferrina com eletrodo de ouro modificado por PAMAM. B) Curva de corrente em função da concentração





fonte: autor

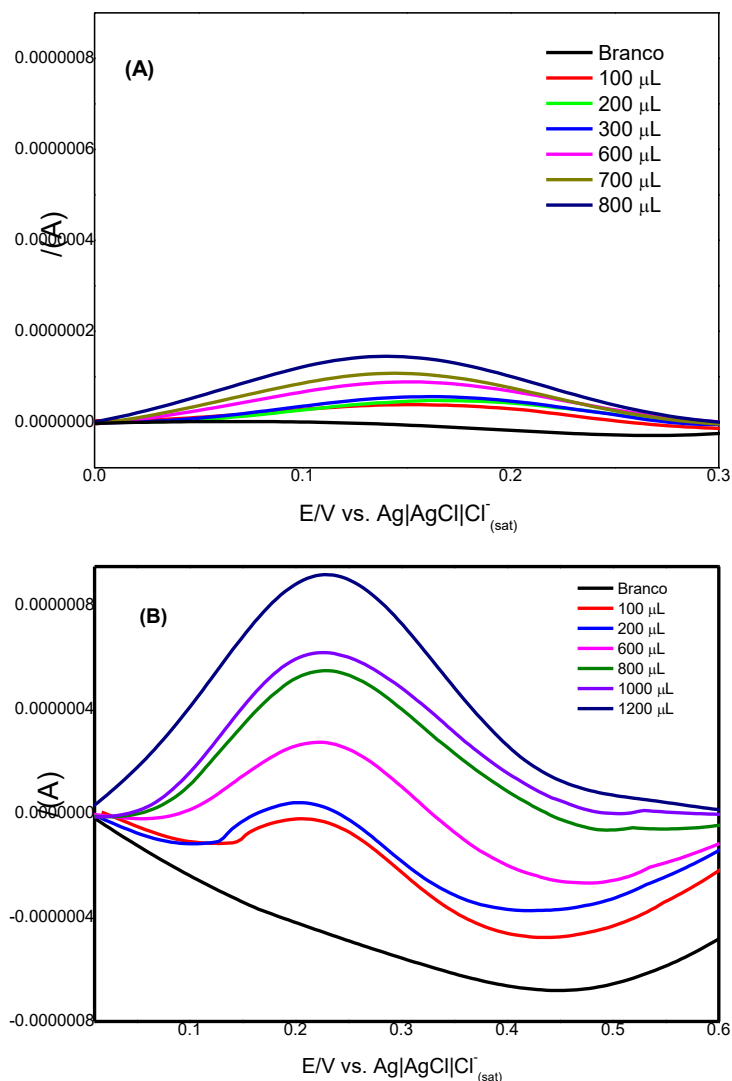
Como mostrado na Figuras 23 A e B, é possível observar que em +0,147 V, à medida que a concentração da amostra no meio aumenta, a resposta eletroquímica no meio aumenta, correspondendo ao processo de transferência de 1 elétron relacionado ao sistema redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. O aparecimento e intensificação do sinal redox à medida que aumenta a concentração da proteína no meio indica sua presença. Desta forma foi possível construir uma curva analítica a partir dos respectivos voltamogramas e realizar a interpolação dessa corrente em função da concentração de Lactoferrina padrão. Essa última avaliação possibilitou obter a sua respectiva equação da reta (Equação 3):

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 47,11(\pm 0,17) \text{ CLf}(\text{mM}) - 4,33(\pm 0,01) \quad \text{Equação 3}$$

Esta interpolação forneceu uma correlação linear igual a 0,994, sua faixa linear foi de 0,112 a 0,12 $\mu\text{g/L}$, obtendo a partir dessa curva valores de $\text{LD} = 3 \text{ sb/ac}$ e $\text{LQ} = 10 \text{ sb/ac}$, onde sb equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto ac corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada, como sendo $\text{LD} = 0,010 \mu\text{g/L}$ e $\text{LQ} = 0,03 \mu\text{g/L}$.

Para o sobrenadante do leite bovino, foi seguido o mesmo protocolo e é possível observar, de acordo com a Figura 24B, o aparecimento e a intensificação do sinal redox em + 0,214 V à medida que a concentração da proteína no meio é aumentada, o que indica um deslocamento do pico em relação à amostra padrão Lactoferrina. Assim, é possível encontrar os valores de 0,01028 g / L e 0,02135 g / L de lactoferrina para as amostras de bovinos e bubalinos, respectivamente (Figuras 24 A e B).

Figura 24: A) Curva do eletrodo de ouro modificada com PAMAM com sobrenadante de leite bovino. B) Curva do eletrodo de ouro modificada com PAMAM com sobrenadante de leite de búfalo.



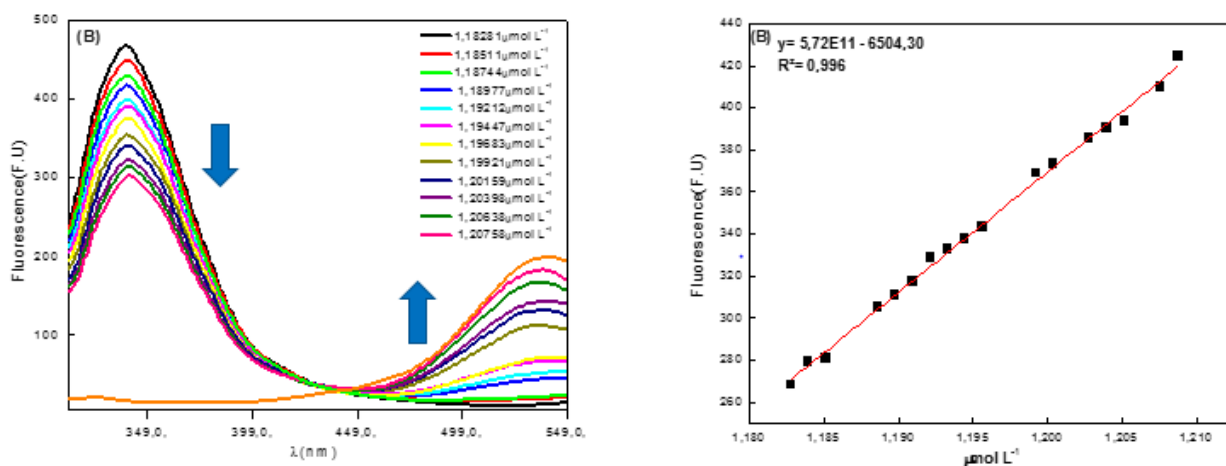
Fonte Autor

Desta forma, o sensor de Au modificado com PAMAM demonstrou boa sensibilidade e que pode ser utilizado em diversas plataformas (papel, plástico, cerâmica) e ser aplicado para análise de lactoferrina em amostras de leite após tratamento especificado nesse trabalho. Quando comparado com outros sensores relatados na literatura (Zhang, 2021), demonstrou sensibilidade similar ou melhor, mas ainda assim lhe confere simplicidade na sua confecção.

5.8. Estudos de interação entre Lactoferrina e Quantum dots CdSe-CdS

Neste estudo, a lactoferrina mostrou uma banda larga e intensa, centrada em 340 nm, quando excitada em 290 nm. A adição de alíquotas da solução QD levou a uma diminuição na intensidade dessa banda, como mostrado na Figura 25A, e a um aumento na banda QD centralizada em 533 nm. A adição de QD à solução de lactoferrina mostrou que a intensidade de fluorescência da lactoferrina diminuía à medida que a concentração de QD aumentava. Como podemos ver na Figura 5A, 2 μ L dos pontos quânticos CdS-CdSe com uma concentração de 0,0121 mmol L⁻¹ foram feitos para lactoferrina a uma concentração de 0,0100 mmol L⁻¹ e à medida que a concentração aumentou a supressão de fluorescência ocorreu. As variações na intensidade que ocorreram podem ser atribuídas ao fato de ter ocorrido interação entre lactoferrina e QD.

Figura 25: A) Análise realizada no fluorímetro da lactoferrina com pontos quânticos CdSe-CdS em solução tampão Tris-HCl pH = 7,0 λ_{exc} = 290nm. B) Curva de concentração em função da intensidade



Para obter a constante de Stern-Volmer (K_q) para o processo, foram feitas adições em diferentes concentrações. Na Figura 26, foi possível correlacionar a fluorescência com a concentração em que podemos obter a constante de Stern - Volmer

Para confirmar o mecanismo de supressão, analisamos a fluorescência dados pela equação de Stern-Volmer a diferentes temperaturas (25°C, 30° C e 35° C). Os resultados foram mostrados na Figura 26 e na Tabela 9. Sendo assim, na figura abaixo pode-se observar que o KSV de bLf diminuiu com o aumento da temperatura e o Valor de K_q foi muito superior a 2,0 1010 L / mol / s (o valor constante de atenuação máxima da colisão por difusão).

Figura 26: Stern-Volmer plota para a supressão de bLf por QDs em diferentes temperaturas.

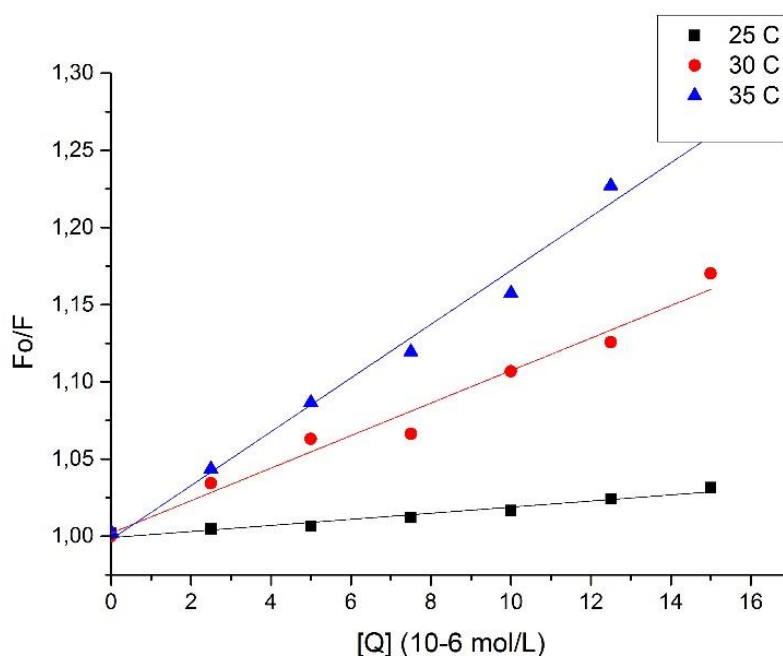


Tabela 9: As constantes de interação entre bLf e QDs.

Componentes	Temperatura (C)	K _{sv} (10 ⁴ L/mol)	K _q (10 ¹² L/mol/s)	R ²
bLf + QDs	25° C	6,88	6,88	0,978
	30° C	5,14	5,14	0,987
	35° C	4,74	4,74	0,995

6. CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados foi possível monitorar a precipitação salina do soro neutralizado, o desenvolvimento de metodologias de separação e purificação de lactoferrina do leite de búfala por cromatografia líquida de gel filtração Sephacryl S-100, sendo realizado o monitoramento através do método fluorimétrico utilizando as condições de comprimentos de onda de excitação e emissão de 295nm e 300 – 550nm;

Em estudo para caracterização da lactoferrina bubalina purificada mostrou que o gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8% em condições redutoras possui uma melhor resolução das bandas comparada as amostras de lactoferrina bubalina purificada, amostra de soro neutralizado e amostra da lactoferrina pura comercial (Sigma, USA).

Os estudos espectrofotométricos da lactoferrina bubalina purificada acoplada com a quercetina permitiram estudar a interação da proteína-flavonoide. Os estudos dos espectros UV-visível de absorção mostraram que a quercetina quando acoplada com a lactoferrina induz o aumento de absorbância máxima do espectro de absorção de UV-vis, quando comparado com o espectro da lactoferrina bubalina parcialmente purificada.

Analisando os espectros de emissão de fluorescência da lactoferrina pura é possível observar que a lactoferrina apresentou uma banda larga e intensa, centrada em 340 nm quando excitada em 290 nm. O aumento da concentração de lactoferrina no meio promoveu um aumento na intensidade dessa banda. Dessa forma, foi possível construir uma curva analítica usando a técnica pela qual foi possível detectar lactoferrina com a concentração de $1,21 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ da amostra padrão de Lactoferrin Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), que apresentou uma boa linearidade.

Análises de voltametria de pulso diferencial foram realizadas para avaliar qualitativa / quantitativamente o comportamento da proteína. Através de estudos iniciais, o intervalo foi limitado a 0,0 V a + 0,3 V para amostras de lactoferrina sintética e para o sobrenadante de leite de vaca. Para o sobrenadante de leite de búfalo, o intervalo foi limitado de 0,0 V a +0,6 V. Isso aconteceu porque a presença do sinal analítico foi mantida nesse intervalo potencial.

Estudos eletroquímicos com lactoferrina foram testados, utilizando eletrodo de ouro modificado com dendrímero PAMAM-2D por diferentes voltametrias (VC e DPV). Em eletrodo de ouro, observou-se um sinal muito discreto, entretanto usando o eletrodo de ouro modificado com PAMAM. A interação da lactoferrina com o PAMAM pode estar ocorrendo através do encapsulamento, portanto sua identificação com esse sensor é eficiente. Assim,

tornou-se possível a construção de curvas de calibração para a lactoferrina utilizando sensor de Au/PAMAM;

O estudo de interação da proteína Lactoferrina com o dendrímero PAMAM, através de métodos espectrofluorimétricos e eletroquímicos mostrou-se bem significativo, pois o sistema apresentado para o PAMAM permite determinar a concentração de lactoferrina em amostras de leite bovino, bubalino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYGUNASEKARA, A.D., HANSIKA, S. T., P. WATTAGE **2 Factors influencing fresh milk consumption and consumer's buying decision. *AgInsight* 2022**

ABDELHAMID. AHMED S., et al Lactoferrin-tagged quantum dots-based theranostic nanocapsules for combined COX-2 inhibitor/herbal therapy of breast câncer. **Nanomedicine**. Vol. 13. Research article

AGUILERA-SIGALAT, J. ROCTON, S.; SANCHEZ-ROYO, J. F.; GALIAN, R. E.; PEREZ-PRIETO, J. Highly fluorescent and photostable organic- and water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots capped with thiols. **RSC Advances**, v.2, 1632–1638, 2012.

ALMAAS H, Holm H, Langsrud T, Flengsrud R, Vegarud GE. In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. **Br J Nutr** 2006;96(3):562-9.

AHVANOOEI, M. R. Rezaei; NOROUZIAN, Mohammad Ali; Vahmani, Payam. Beneficial Effects of Vitamins, Minerals, and Bioactive Peptides on Strengthening the Immune System Against COVID-19 and the Role of Cow's Milk in the Supply of These Nutrients. **Biological Trace Element Research**. 2021

ALVIM M. J. et al. Sistema de Produção, 7. Importância Econômica. Juiz de Fora: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. 2004. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/sistema/7/importancia.html>>. Acesso em: 5 jun. 2022

AMELIA, M.; LINCHENEAU, C.; SILVI, S.; CREDI, A. Eletrochemical properties CdSe and CdTe quantum dots. **Chemical Society Review**, v. 41, 2012

BAKER, EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. **Biochimie** 2009;91(1):3-10.

BELJAARS, L., van der Strate, B. W., Bakker, H. I., Reker-Smit, C., Wiegman, F. C., Harmsen, M. C et al., (2004). Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, 63(3), 197–208.

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.

BERLUTTI, F. Pantanella, T. Natalizi, A. Frioni, R. Paesano, A. Polimeni, *et al.* Antiviral properties of lactoferrin – a natural immunity. **molecule** (2011), pp. 6992-7018

Baldi A, Ioannis P, Chiara P, Eleonora F, Roubini C, Vittorio D. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. **J Dairy Res** 2005;72 Spec No:66-72.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Qualidade do leite brasileiro e os desafios para atendimento das exigências internacionais. In: ZOCCAL, R. et al. **Leite: uma cadeia produtiva em transformação**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2004. p. 235-243.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro, Março de 2012. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201104_publ_completa.pdf>. Acesso em: 15 maio de 2022

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Oxford University Press, 1996, v. 5.

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

CAMPIONE, E.; COSIO, T.; ROSA, L.; Lanna, C.; Di Girolamo, S.; Gaziano, R.; Valenti, P.; Bianchi, L. Lactoferrin as protective natural barrier of respiratory and intestinal mucosa against coronavirus infection and inflammation. **Int. J. Mol. Sci.** 2020, 21, 4903.

CAMPIONE, E.; Lanna, C.; Cosio, T.; Rosa, L.; Conte, M.P.; Iacovelli, F.; Romeo, A.; Falconi, M.; Del Vecchio, C.; Franchin, E.; et al. Pleiotropic effect of lactoferrin in the prevention and treatment of COVID-19 infection: Randomized clinical trial, in vitro and in silico preliminary evidences. **bioRxiv** 2020. Available online: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.11.244996v4> (accessed on 26 July 2021)

CAMPIONE, E.; Lanna, C.; Cosio, T.; Rosa, L.; Conte, M.P.; Iacovelli, F.; Romeo, A.; Falconi, M.; Del Vecchio, C.; Franchin, E.; et al. Lactoferrin against SARS-CoV-2: In vitro and in silico evidences. **Front. Pharmacol.** 2021, 12, 666600.

CARMONA, F. et al. Monitoring lactoferrin iron levels by fluorescence resonance energy transfer: A combined chemical and computational study. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 439–447, 2014.

CANDIDO, A. C. L., M. P. G. da Silva, E. G. da Silva, and F. C. de Abreu, “Electrochemical and spectroscopic characterization of the interaction between β -lapachone and PAMAM derivatives immobilized on surface electrodes,” *J. Solid State Electrochem.*, vol. 22, no. 5, pp. 1581–1590, 2018, doi: 10.1007/s10008-018-3880-8.

CARRION, C. C.; ATABAKHSHI-KASHI, M.; CARRIL, M.; Khosro Khajeh, and PARAK, W. Taking advantage of hydrophobic fluorine interactions for selfassembled nanoclusters of quantum dots as delivery platform for enzymes, **Angewandte Chemie**. 2018

COELHO, Yara Luiza; Cínthia das Dores Aguiar b, Hauster Maximiler Campos de Paula a, Isabela Araujo Marques a, Lívia Neves Santa Rosa c, Luciano Sindra Virtuoso b, Alfredo Duarte d, Ana Clarissa dos Santos Pires c, Luis Henrique Mendes da Silva a,† Exploring the interaction between lactoferrin and CdTe quantum dots: Energetic and molecular dynamic study. **Journal of Molecular Liquids** 356 (2022) 119005

CHATTERTON DEW, Rasmussen JT, Heegaard CW, Sorensen ES, Petersen TE. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology* 2004;15(7-8):373-83.

CHEN JR, Suetsuna K, Yamauchi F. Isolation and Characterization of Immunostimulative Peptides from Soybean. 1995;6(6):310-3.

- CHAUHAN, S., POWAR, P. and Rahul Mehra. A review on nutritional advantages and nutraceutical properties of cow and goat milk. 2021. **International Journal of Applied Research** 2021; 7(10): 101-105
- CHIARI-ANDRÉO, B. G. et al. Drug Delivery Using Theranostics: An Overview of its Use, Advantages and Safety Assessment. *Current Nanoscience*, v. 16, n. 1, p. 3–14, 2019.
- DANTAS, J. S. **Palestra proferida na abertura do Congresso Internacional do Leite**, 10. 2011, Maceió: Centro de Convenções, 26 maio. 2020
- DROZDOV, K. A. KOCHNEV, V. I.; DOBROVOLSKY, A. A.; POPELO, A. V. RUMYANTSEVA, M. N. Photoconductivity of structures based on the SnO₂ porous matrix coupled with core-shell CdSe/CdS quantum dots. **Applied Physics Letters**, v. 03 2013
- DU, D.; DING, J.; TAO, Y.; LO, H.; CHEN, X. CdTe nanocrystal-based electrochemical biosensor for the recognition of neutravidin by anodic stripping voltammetry at electrodeposited bismuth film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, 2008
- DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. **Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 541
- DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; Pimenta, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos (Embrapa Agroindústria Tropical).Embrapa: Fortaleza, 2008
- EKMEKCIOGLU C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. **Food Chemistry** 2002;76(2):225-30.
- ERIKSEN EK, Holm H, Jensen E, Aaboe R, Devold TG, Jacobsen M, et al. Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. **Br J Nutr** 2010;1-8.
- ELBARBARY HA, Abdou AM, Park EY, Nakamura Y, Mohamed HA, Sato K. Novel antibacterial lactoferrin peptides generated by rennet digestion and autofocusing technique. **International Dairy Journal** 2010;20(9):646-51.
- 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.
- FABER, C. et al. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2438–2444, 2005.
- FERREIRA, R. C. **Desafios para o Brasil**: A competitividade da Carne Bovina na Europa. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, ano XIV, n.3, p. 33-42, 2005. ISSN 1413-4969.
- FLORES-VILLASEÑOR, H. et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 569–578, 2010.
- FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL (FBB). **Bovinocultura de Leite: desenvolvimento regional sustentável – série cadernos de propostas para atuação em cadeia produtivas**.

Brasília, v.1, 2010. Disponível em:

<<http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol1BovinoLeite.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2020

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, 2012.

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

GOMES, S. T. **Diagnóstico da cadeia produtiva do leite de Goiás**: relatório de pesquisa. Federação da Agricultura e Pecuária de Goiás – FAEG. Goiânia, 2009. 64p.

GONZALEZ-CHAVEZ, S.A., AREVALO-GALLEGOS S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents** 2009;33(4).

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.

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

HUANG, Q.; ZHANG, H.; HU, S.; LI, F.; WENG, W.; CHEN, J.; Qingxiang WANG, Q.; HE, Y.; ZHANG, W.; BAO, X. A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au@carbon dots–chitosan composite film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, 277–280, 2014.

KAZIMIERSKA, K.; Kalinowska-Lis, U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. **Molecules** **2021**, 26, 3253. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253>

KHAN, J. A. et al. Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: Crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual role. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 3, p. 751–761, 2001.

KALANTZI L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. **Pharm Res** 2006;23(1):165-76.

KARTHIKEYAN S, Sharma S, Sharma AK, Paramasivam M, Yadav S, Srinivasan A, et al. Structural variability and functional convergence in lactoferrins. **Current Science** 1999;77(2):241-55.

KIMURA M, Nam MS, Ohkouchi Y, Kumura H, Shimazaki K, Yu DY. Antimicrobial peptide of Korean native goat lactoferrin and identification of the part essential for this activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2000;268(2):333-6.

KHAN JA, Kumar P, Paramasivam M, Yadav RS, Sahani MS, Sharma S, et al. Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: Crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 angstrom resolution and structural basis of its dual role. **Journal of Molecular Biology** 2001;309(3):751-61.

LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970;227(5259):680-&.

LIEPKE C, Adermann K, Raida M, Magert HJ, Forssmann WG, Zucht HD. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *European Journal of Biochemistry* 2002;269(2):712-8.

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.

KIM, K. S. et al. **Purification and characterization of mongolian mare**

lactoferrin *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2009.

MENDIS E, Rajapakse N, Byun HG, Kim SK. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences** 2005;77(17):2166-78.

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

SILVA, NAI, A.; Lorè, N.I.; Pagani, A.; De Lorenzo, R.; Di Modica, S.; Saliu, F.; Cirillo, D.M.; Rovere-Querini, P.; Manfredi, A.A.; Silvestri, Coelho, Yara Luiza; Cínthia das Dores Aguiar b, Hauster Maximiler Campos de Paula a, Isabela Araujo Marques a, Livia Neves Santa Rosa c, Luciano Sindra Virtuoso b, Alfredo Duarte d, Ana Clarissa dos Santos Pires c, Luis Henrique Mendes da Silva a, † Exploring the interaction between lactoferrin and CdTe quantum dots: Energetic and molecular dynamic study. **Journal of Molecular Liquids** 356 (2022) 119005

NOGUEIRA NETTO, V.; MARTINS, M. C.; NERI, C. B. de S. Terra prometida.

Agroanalysis, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 46-51, 2003

OLIVEIRA M. A. A.; OSÓRIO, M. M. Consumo de leite de vaca e anemia ferropriva na infância. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.81 n.5, p. 361-367, 2005. ISSN 0021-7557

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13,n.62, p.10-13, 1999.

PEREIRA, Paula C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition** (2014) 619–627

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.

PIHLANTO-LEPPALA A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. **Journal of Dairy Research** 2000;67(1):53-64.

PIHLANTO-LEPPALA A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 2000;11(9-10):347-56

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.

RADI, A. E. Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Pharmaceutical Analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, 728 – 752, 2010.

RECIO I, Visser S. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. **International Dairy Journal** 2000;10(9):597-605.

RECIO I, Visser S. Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. **J Chromatogr A** 1999;831(2):191-201.

ROSA, L.; Cutone, A.; Lepanto, M.S.; Paesano, R.; Valenti, P. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. **Int. J. Mol. Sci.** 2017, 18, 1985.

ROSA, L.; Tripepi, G.; Naldi, E.; Aimati, M.; Santangeli, S.; Venditto, F.; Caldarelli, M.; Valenti, P. Ambulatory COVID-19 Patients Treated with Lactoferrin as a Supplementary Antiviral Agent: A Preliminary Study. *J. Clin. Med.* **2021**, 10, 4276. <https://doi.org/10.3390/jcm10184276>

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

SEGANTI, L., Di Biase, A. M., Marchetti, M., Pietrantoni, A., Tinari, A., & Superti, F. (2004). Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. **Biometals**, 17(3), 295--299.

SREEDHARA A, Flengsrud R, Prakash V, Krowarsch D, Langsrud T, Kaul P, et al. A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin. **International Dairy Journal** 2010;20(7):487-94.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutricao**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.

SILVA, M. P. G., Candido, A. C. L., S. de L. Lins, T. M. de Aquino, F. J. B. Mendonça, and F. C. de Abreu, “Electrochemical investigation of the toxicity of a new nitrocompound and its interaction with β -cyclodextrin and polyamidoamine third-generation,” **Electrochim. Acta**, 2017, doi: 10.1016/j.electacta.2017.08.111.

SILVA, A. C. A.; SILVA, M. J. *Controlling the Cytotoxicity of CdSe Magic-Sized Quantum Dots as a Function of Surface Defect Density*. **Nano Letters**. V. 14. 2014

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.

- SEGANTI, L., Di Biase, A. M., Marchetti, M., Pietrantoni, A., Tinari, A., & Superti, F. (2004). Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. **Biomaterials**, 17(3), 295--299.
- SHARBAFI, R. et al. Isolation and purification of bovine Lactoferrin. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**, v. 21, n. 84, p. 44–51, 2011.
- SHRIVER, D. F.; ATKINS O. Química Inorgânica. Ed. Porto Alegre 2008 Bookman
- STEIJNS JM, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **Br J Nutr** 2000;84 Suppl 1:S11-S17.
- Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR. Antihypertensive effects of Undaria pinnatifida (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004;15(5):267-72.
- Tsuruki T, Kishi K, Takahashi M, Tanaka M, Matsukawa T, Yoshikawa M. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean beta-conglycinin, is an fMLP agonist. *Febs Letters* 2003;540(1-3):206-10.
- Troost FJ, Steijns J, Saris WH, Brummer RJ. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *J Nutr* 2001;131(8):2101-4.
- VAN DER STRATE BWA, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DKF. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research** 2001;52(3):225-39.
- Sreedhara A, Flengsrud R, Langsrud T, Kaul P, Prakash V, Vegarud GE. Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *Biomaterials* 2010;23(6):1159-70.
- VILELA, D. **Palestra proferida na abertura do Congresso Internacional do Leite, 10. Maceió**, Centro de Convenções, 26 out. 2011, Maceió, 2020
- VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. de. Políticas para o leite no Brasil: Passado, Presente e Futuro. In.: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Maringá 2002. **Anais...** Maringá. 2002. p.1-26.
- 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.
- SIQUEIRA, K. B., et al. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica 104**. Juiz de Fora, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, 2010 12p. ISSN 1678-07X
- NOGUEIRA NETTO, V.; MARTINS, M. C.; NERI, C. B. de S. Terra prometida. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 46-51, 2003.
- TRONCO, V. M. **Manual de Inspeção da Qualidade do Leite**. 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2003. 192p.
- RITZ, S., S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer, V. Mailänder, Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake, **Biomacromolecules** 16 (4) (2015) 1311– 1321, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00108>.

- SEGATO, T. P. **Avanços no processo de fabricação de microdispositivos analíticos e em seu acoplamento com a detecção condutimétrica sem contato**. 2011. Tese. Doutorado em Química – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 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.
- SOBRINHO, F. F; COUTINHO, G. H; COURA, J. D. **Coleta de leite a granel**. Belo Horizonte. MG.: Fundação João Pinheiro, 1995.
- VAN DER KRAAN, M., Groenink J, Nazmi K, Veerman ECI, Bolscher JGM, Amerongen AVN. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides** 2004;25(2):177-83.
- VAN DER STRATE, B. W., Bakker, H. I., Reker-Smit, C., Wiegman, F. C., Harmsen, M. C et al., (2004). Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, 63(3), 197--208.
- VASUDEVAN, D.; GADDAM, R. R.; TRINCHI, A.; COLE, I. Core-shell quantum dots: Properties and applications. **Journal of alloys and Compound**. 2015
- WANG, Bo, Yakindra Prasad Timilsena, Ewan Blanch & Benu Adhikari (2017): Lactoferrin: Structure, Function, Denaturation and Digestion, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2017.1381583
- WAKABAYASHI, H. et al. / Lactoferrin for prevention of common viral infections **J Infect Chemother** 20 (2014) 666e671 667
- WILLET, T Walter C. Willett, M.D., Dr.P.H., and David S. Ludwig, M.D., Ph.D. Milk and Health. **The New England Journal of Medicine**. 2020
- YOSHIDA, S., Z. Wei, Y. Shinmura, and N. Fukunaga Separation of Lactoferrin-a and -b from Bovine Colostrum Faculty of Applied Biological Science, **Dairy Chemistry Laboratory**, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan 739-8528
- ZHANG, Y., Chao Lu and Jin. Review Lactoferrin and Its Detection Methods: A Review Zhang * **Nutrients** 2021, 13(8), 2492; <https://doi.org/10.3390/nu13082492>
- ZHAO, X., HARRIS, M. M.; LIU, J.; WANG, K. X.; CHEN, J. S. Uric Acid as an Electrochemically Active Compound for Sodium-Ion Batteries: Stepwise Na⁺-Storage Mechanisms of π -Conjugation and Stabilized Carbon Anion. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, 33934-33940, 2017.
- ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. **Diagnóstico da Pecuária de Leite Nacional : Estudos Preliminares, Contribuição para o Plano Pecuário 2012**. Juiz de Fora, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. 2011. Disponível em: <http://www.cnpagl.embrapa.br/nova/Plano_Pecuario_2012.pdf>. Acesso em: 25 de maio de 2020.
- ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V. **Uma análise conjuntural da produção de leite no Brasil**. Juiz de Fora, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Minas Gerais, ano 2, n.19, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpagl.embrapa.br/panorama/conjuntura19.html>>. Acesso em: 18 de maio 2020.

8. Considerações finais e perspectivas

- ✓ Otimização da purificação da lactoferrina presente no leite.
- ✓ Otimização do sistema eletroquímico para obtenção de uma resposta mais rápida
- ✓ Estudo de interferentes em amostras sem tratamento com o objetivo de avaliar se o mesmo pode comprometer os resultados obtidos.
- ✓ Miniaturização do sistema eletroquímico
- ✓ Estudo da Associação entre PAMAM, Quantum dot e Lactoferrina