

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

EDSON FERREIRA DA SILVA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA DE
LACTOFERRINA DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) E AVALIAÇÃO DE SUA
INTERAÇÃO COM FÁRMACOS

Maceió
2021

EDSON FERREIRA DA SILVA

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA DE
LACTOFERRINA DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) E AVALIAÇÃO DE SUA
INTERAÇÃO COM FÁRMACOS

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, como requisito para conclusão do curso de mestrado com titulação em mestre em ciência.

Área de concentração: Bioquímica e biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Co-orientador: Prof. Dra. Sonia Salgueiro Machado.

Maceió
2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas

Biblioteca Central

Divisão de Tratamento Técnico

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

S586p Silva, Edson Ferreira da.

Purificação parcial e caracterização por pluviometria de lactoferrina de bubalinos (*Bubalus bubalis*) e avaliação de sua interação com fármacos / Edson Ferreira da Silva – 2021.

127 f. : il color.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Coorientadora: Sonia Salgueiro Machado.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 110-127.

1. Lactoferrina. 2. Cromatografia líquida. 3. Purificação isoelétrica.
4. Espectroscopia ultravioleta. I. Título.

CDU: 66.081.3:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação do mestrando **EDSON FERREIRA DA SILVA** intitulada: **“PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO POR FLUORIMETRIA DE LACTOFERRINA DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) E AVALIAÇÃO DE SUA INTERAÇÃO COM FÁRMACOS”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 02 de setembro de 2021, às 14h, por meio de videoconferência pelo *Google Meet*.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ADRIANA XIMENES DA SILVA, UFAL
Examinadora Externa ao Programa

Profa. Dra. SONIA SALGUEIRO MACHADO, UFAL
Coorientador - Examinadora Externa ao Programa

Prof. Dr. FRANCIS SOARES GOMES, UFAL
Examinador Interno

Prof. Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA, UFAL
Examinador Interno

Profa. Dra. FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO, UFAL
Orientador - Presidente

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

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

Ayrton Sena.

AGRADECIMENTO

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

A professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, pela oportunidade de realizar este trabalho acreditando em minha capacidade sem ao menos me conhecer.

A professora Dra. Sonia Salgueiro Machado, que me norteou em toda a pesquisa e sempre presente me ensinou a pensar como um cientista e ser um cientista.

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

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas – (UFAL).

A todos os professores do IQB e do Curso Superior de Laticínios - IFAL que contribuíram diretamente ou indiretamente para a construção do meu conhecimento desde as graduações até hoje.

Aos professores doutores que se disponibilizaram para compor a banca examinadora: Dr. Hugo Juarez, Dr. Francis Soares, Dr. Jose Maria, Dra. Adriana Ximenes, Dr. Diógenes Meneses e Dra. Fabricia da Rocha.

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

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

Aos professores do laboratório de eletroquímica Dra. Carmem Lúcia e o Dr. Leandro, bem como ao professor Dr. Mário Meneghetti pelo compartilhamento dos laboratórios para realizar as atividades de pesquisa.

Aos funcionários Aldyr e Dona Geruza.

Aos órgãos de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Heleno Vicente e Dorginete Ferreira, meus irmãos Claudio, Cladevan, De assis, Alexandra, Maria José e Claudelice por me apoiarem e incentivarem todos esses anos e a minha namorada, Claudiane Maria que sempre me apoiou nos meus estudos durante os 9 anos de namoro.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** 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..... 28
- Figura 2.** Sítio de ligação ao ferro da lactoferrina. Sítio de ligação do ferro no lobo N: duas tirosinas (Y92 e Y192), um ácido aspártico (D60), uma histidina (H253) e um ânion carbonato (CO_3^{2-}) juntamente com o resíduo de arginina (R121). Dois resíduos básicos atrás do local do ferro, uma arginina (R210) e uma lisina (K301) ajudam a modular a liberação de ferro. 30
- Figura 3.** 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..... 32
- Figura 4.** (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. 35
- Figura 5.** Estrutura do peptídeo Lf (1-11)..... 37
- Figura 6.** Estrutura do peptídeo Lactoferrampina. 40
- Figura 7.** Estrutura do peptídeo Lactoferricina..... 42
- Figura 8.** Funções biológicas da lactoferrina (Lf). 44
- Figura 9.** Mecanismo de ação antibacteriana da lactoferrina (LF). (A) Bactérias Gram-positivas: LF está ligada a moléculas carregadas negativamente da membrana celular, como o ácido lipoteicóico, neutralizando a carga da parede e permitindo a ação de

outros compostos antibacterianos, como a lisozima. (B) Bactérias Gram-negativas: LF pode se ligar ao lipídio A do lipopolissacarídeo, causando liberação desse lipídio com consequente dano à membrana celular.47

Figura 10. Um modelo de entrada na célula SARS-CoV e o papel protetor da lactoferrina na infecção por SARS-CoV. (A) HSPGs desempenham um papel importante no processo de entrada da célula SARS-CoV. Os locais de ancoragem fornecidos pelos HSPGs permitem o contato inicial entre o SARS-CoV e as células hospedeiras e a concentração de partículas virais na superfície celular. O SARS-CoV rola pela membrana celular ligando-se aos HSPGs e faz a varredura em busca de receptores de entrada específicos, o que leva à entrada subsequente na célula. (B) LF bloqueia a infecção de SARS-CoV ligando-se a HSPGs. A expressão de LF pode ser regulada para cima quando o SARSCoV infecta o corpo humano. LF localiza em HSPGs de superfície celular e evita a interação preliminar entre o vírus e as células hospedeiras e o processo de internalização subsequente.50

Figura 11. Fluxograma do protocolo processamento.....72

Figura 12. Fluxograma do protocolo do fracionamento proteico por precipitação salina (*salting-out*).....74

Figura 13. Protocolo de purificação e caracterização.75

Figura 14. Protocolo de isolamento pelo pl de lactoferrina.76

Figura 15. Espectro de fluorescência de lactoferrina bubalina das frações salinas dos perfis de precipitação salina (*salting-out*) (pH 7, 290 nm).....82

Figura 16. Perfil Cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspendido 40 – 60% (300µL) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.83

Figura 17. Espectros de fluorescência da eluição das frações eluidas e reunidas do pico 1 (frações 12-16), pico 2 (frações 17-22) e pico 3 (frações 23-26) em cromatografia filtração em gel Sephacryl S – 100 (pH, 7; 290nm).....85

Figura 18. Espectros de fluorescência dos picos 1 e 2 após passar no concentrador de proteínas.....87

Figura 19. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas por Sephacryl S-100:(a) gel SDS – PAGE de concentração 8% e (b) gel SDS-PAGE de concentração 12% (LfS: lactoferrina comercial Sigma (16,80µg), WfB: Sobrenadante Neutralizado (6,06µg) e LfB: lactoferrina bubalina purificada (13,42 µg; (15,10µg)).....89

| | |
|---|-----|
| Figura 20. Espectros de fluorescência dos perfis da titulação do soro ácido no isolamento da Lf pelo pl. | 92 |
| Figura 21. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação pelo pl 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 ressuspendido à pH 5.2 (90 µg), (5): 2ª sobrenadante à pH5.2 (90 µg), (6): 2ª precipitado ressuspendido à pH 5.2 (90 µg), (7): 1ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (8): 1ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 (90 µg), (9): 2ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg) e (10): 2ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 (90 µg). | 96 |
| Figura 22. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação isoelétrica pelo pl 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 ressuspendido à pH 8.3 (90 µg), (4): 1ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (5): 2ª precipitado ressuspendido 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. | 97 |
| Figura 23. Espectro de absorção de UV-vis de lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada por purificação isoelétrica. | 98 |
| Figura 24. Espectro UV-vis da amoxicilina 2,5 Mm..... | 100 |
| Figura 25. Espectro de absorção de UV-vis de (L) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada por purificação isoelétrica (mM), (A) amoxicilina (2,5 mM) e (L + A) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de amoxicilina (3×10^{-6} mol.L ⁻¹). | 101 |
| Figura 26. Espectros UV-visíveis de lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de amoxicilina nas concentrações (0,1,2,3, 4,5,6,7,8) $\times 10^{-6}$ mol/L. ... | 102 |
| Figura 27. Espectro UV-vis da quercetina 2,5 Mm. | 104 |
| Figura 28. Espectro de absorção de UV-vis de (L) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada por purificação isoelétrica (mM), (Q) quercetina (2,5 mM) e (L + Q) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de quercetina (3×10^{-6} mol.L ⁻¹). | 105 |
| Figura 29. Espectros UV-visíveis de lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de quercetina (QCT) nas concentrações (0,1,2,3, 4,5,6,7,8) $\times 10^{-6}$ mol/L. | 107 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro do leite. | 25 |
| Tabela 2. Comparação da sequência de aminoácidos Lf (1-11) em Lf de diferentes espécies de mamíferos. | 38 |
| Tabela 3. Comparação da sequência de aminoácidos da lactoferrampina para diferentes espécies de mamíferos..... | 40 |
| Tabela 4. Comparação da sequência de aminoácidos da lactoferricina para diferentes espécies de mamíferos. | 43 |
| Tabela 5. Resinas utilizadas na cromatografia líquida de purificação de lactoferrinas de equino, camelo, caprino, bovino e humano. | 61 |
| Tabela 6. Quantidade de sulfato de sódio para a precipitação salina. | 73 |
| Tabela 7. Balanço de massa do processamento do leite de búfalo..... | 79 |
| Tabela 8. Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de precipitação salina (<i>salting-out</i>)..... | 81 |
| Tabela 9. Teor de proteínas dos picos após passar em concentradores de proteínas. | 86 |
| Tabela 10. Balanço de massa do protocolo de isolamento da lactoferrina de búfalo pelo processo de purificação isoelétrica (pI). | 90 |
| Tabela 11. Concentração de proteínas nos perfis do ponto isoelétrico do isolamento da lactoferrina. | 91 |

RESUMO

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína com massa molecular de cerca de 80 kDa, pertencente à família das transferrina tendo a habilidade específica de realizar ligação com o íon ferro. Presente em leites de mamíferos, é considerada uma proteína multifuncional, desempenhando vários papéis biológicos, tais como atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e imunomoduladoras. Este trabalho teve o objetivo de purificar e caracterizar a lactoferrina de bubalinos e avaliar a interação proteína-antibiótico e proteína-flavonoide. O processamento do leite de búfala iniciou-se com a separação da gordura por centrifugação. O leite desnatado foi acidificado com HCl 0,1 M até o pH 4.6 obtendo o soro acidificado. 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. No protocolo de purificação por cromatografia líquida o soro ácido foi neutralizado com NaOH até o pH 6.8 e o sobrenadante obtido por centrifugação foi submetido a precipitação salina nos perfis de 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As análises fluorimétricas das frações salinas foram realizadas em comprimento de excitação a 290 nm e comprimentos de onda de emissão entre 300-550 nm. O perfil salino do precipitado ressuspendido 40-60% apresentou o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina. O precipitado ressuspendido 40-60% foi aplicado a cromatografia líquida em gel filtração Sephacryl S-100 (tamanho (1x60 cm) com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL em tampão fosfato 0,2 M pH 7.7). As frações 12 a 16 apresentaram o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina. A purificação isoelétrica do pl da lactoferrina o soro ácido foi titulado até pH 5.2 com NaOH 1 M, o sobrenadante obtido por centrifugação foi titulado até o pH 8.3 e centrifugado. As amostras dos sobrenadantes e precipitados ressuspendidos foram submetidas a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford e realizados os estudos fluorimétricos e eletroforético. Realizou-se os estudos de espectroscopia UV-vis de absorção de lactoferrina com amoxicilina e quercetina. A eletroforese SDS-PAGE à 8% obteve uma melhor resolução carga/massa das bandas marcadas pelo corante, que mostra a presença de duas entidades proteicas na fração da lactoferrina parcialmente purificada e uma banda no padrão lactoferrina bovina comercial no gel SDS-PAGE à 8%. O precipitado ressuspendido a pH 8.3 da purificação isoelétrica obteve uma banda de proteína superior 75 KDa coerente com o padrão de lactoferrina bovina comercial. O estudo mostrou a purificação de lactoferrina bubalina por dois métodos distintos e o monitoramento por fluorimetria do processo de purificação da lactoferrina bubalina, bem como os estudos de UV-vis absorção de lactoferrina com fármacos mostraram que a complexação dessas substâncias podem gerar alterações na estrutura da proteína os resultados sugerem que a adição de fármacos altera a polaridade em torno da proteína em que alguns resíduos como Trp e Tyr ficam expostos a um ambiente mais polar, enquanto alguns resíduos externos ficam embutidos em proteínas globulares.

Palavras-chaves: Lactoferrina, Cromatografia líquida, Purificação isoelétrica, Espectroscopia UV-vis.

ABSTRACT

Lactoferrin (Lf) is a glycoprotein with a molecular mass of about 80 kDa, belonging to the transferrin family, having the specific ability to carry out binding with the iron ion. Present in mammalian milk, it is considered a multifunctional protein, playing several biological roles, such as antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and immunomodulatory activities. This work aimed to purify and characterize lactoferrin from buffaloes and evaluate the protein-antibiotic and protein-flavonoid interactions. The processing of buffalo milk began with the separation of fat by centrifugation. The skimmed milk was acidified with 0.1 M HCl to pH 4.6 obtaining the acidified whey. At this stage, the processing of acid whey is subdivided into two distinct processes: the processing of the acid whey for purification by chromatography and the processing of the acid whey for isolation by the isoelectric point of lactoferrin. In the purification protocol by liquid chromatography, the acid serum was neutralized with NaOH to pH 6.8 and the supernatant obtained by centrifugation was subjected to saline precipitation in the profiles of 0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80 % saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fluorimetric analyzes of the saline fractions were performed at excitation length at 290 nm and emission wavelengths between 300-550 nm. The saline profile of the 40-60% resuspended precipitate showed the characteristic fluorescence extinction spectrum of lactoferrin. The 40-60% resuspended precipitate was applied to liquid chromatography on Sephacryl S-100 gel filtration (size (1x60 cm) with a flow of 0.1 mL/min, bed volume of 50 mL in 0.2 M phosphate buffer pH 7.7). Fractions 12 to 16 showed the characteristic fluorescence extinction spectrum of lactoferrin. Isoelectric purification of the pl of lactoferrin acid serum was titrated to pH 5.2 with 1 M NaOH, the supernatant obtained by centrifugation was titrated to pH 8.3 and centrifuged. The samples of the resuspended supernatants and precipitates were subjected to the quantification of protein content by the Bradford method and the fluorimetric and electrophoretic studies were carried out. UV-vis absorption spectroscopy studies of lactoferrin with amoxicillin and quercetin were performed. The 8% SDS-PAGE electrophoresis obtained a better charge/mass resolution of the dye-labeled bands, which shows the presence of two protein entities in the partially purified lactoferrin fraction and a band in the commercial bovine lactoferrin standard in the 8 SDS-PAGE gel %. The precipitate resuspended at pH 8.3 from the isoelectric purification obtained a higher 75 KDa protein band consistent with the commercial bovine lactoferrin standard. The study showed the purification of lactoferrin buffalo by two different methods and the monitoring by fluorimetry of the purification process of lactoferrin buffalo, as well as the UV-vis absorption studies of lactoferrin with drugs showed that the complexation of these substances can generate changes in the structure of the protein the results suggest that the addition of drugs changes the polarity around the protein in that some residues such as Trp and Tyr are exposed to a more polar environment, while some external residues are embedded in globular proteins.

Key words: Lactoferrin, Liquid chromatography, Isoelectric purification, UV-vis spectroscopy.

LISTA DE ABREVIATURA E SIMBOLOS

| | |
|---------|---|
| µg | micrograma |
| Apo-Lf | Apo-Lactoferrina |
| Arg | Arginina |
| Asp | Aspartato |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| bLf | Lactoferrina Bovina |
| bLfcin | Lactoferricina Bovina |
| COVID19 | Doença de Coronavírus de 2019 |
| Cys | Cisteína |
| DAMPs | Padrões Moleculares Associados a Perigo |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| g | Gramas |
| GAGs | Glicosaminoglicanos |
| HeLa | Células Cancerosas Epiteliais Humanas |
| His | Histidina |
| HIV | Vírus Imunodeficiência Humana |
| hLf | Lactoferrina Humana |
| hLfcin | Lactoferricina Humana |

| | |
|---------------|---------------------------------|
| Holo-Lf | Holo-Lactoferrina |
| HSPGs | Proteoglicanos Heparano Sulfato |
| IFN- α | Interferon tipo I - α |
| IFN- β | Interferon tipo I - β |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IL | Interleucina |
| Ile | Isoleucina |
| KDa | Quilo Dalton |
| Kg | Quilograma |
| L | Litro |
| LC50 | Concentração Letal a 50% |
| Leu | Leucina |
| Lf | Lactoferrina |
| Lfampina | Lactoferrampina |
| Lfcin | Lactoferrincina |
| Lfcin-H | Lactoferricina Humana |
| LLF | Lactoferrina Bovina Lipossomal |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MIC | Concentração Inibitória Mínima |

| | |
|-----------|--|
| MTB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NF | Fator Nuclear |
| NK | Celular Natural Killer |
| nmol | Nano mol |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados a Patógenos |
| pH | Percentual Hidrogeniônico |
| pI | Ponto Isoelétrico |
| rHLF | Lactoferrina Humana Recombinante |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SARS-CoV | Síndrome Respiratória Aguda |
| Tfs | Transferrinas |
| TH1 | Célula TH1 |
| TLRs | Receptores Toll-like |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| Tyr | Tirosina |
| UFC | Unidade Formadoras de Colônias |
| μ mol | Micro mol |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS | 23 |
| 2.1 | Leite bubalino | 23 |
| 2.2 | Proteínas do soro do leite | 24 |
| 2.3 | Lactoferrina | 27 |
| 2.3.1 | Estrutura Da Lactoferrina (Lf) | 27 |
| 2.3.2 | Sítio de ligação ao íon Fe ³⁺ | 29 |
| 2.3.3 | Dinâmica estrutural da lactoferrina | 30 |
| 2.4 | Atividade de peptídeos oriundo da lactoferrina | 34 |
| 2.4.1 | Lf 1-11 | 35 |
| 2.4.2 | Lactoferrampina | 39 |
| 2.4.3 | Lactoferricina | 41 |
| 2.5 | Funções biológicas da lactoferrina | 43 |
| 2.5.1 | Atividade antibacteriana da lactoferrina | 44 |
| 2.5.2 | Atividade antiviral | 48 |
| 2.5.3 | Atividade antifúngica | 50 |
| 2.5.4 | Atividade antiparasitária | 52 |
| 2.5.5 | Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora | 53 |
| 2.5.6 | Atividade anticarcinogênica da lactoferrina | 56 |
| 2.6 | Técnicas de purificação de proteínas | 59 |
| 2.6.1 | Técnica de precipitação salina (<i>salting-out</i>) | 59 |
| 2.6.2 | Purificação de Lactoferrinas de distintos mamíferos e suas aplicações | 60 |
| 2.7 | Purificação isoelétricas de mais diversas proteínas | 63 |
| 2.8 | Estudos espectroscópicos com proteínas | 64 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.9 | Estudos espectroscópicos proteínas com Flavonoides | 65 |
| 2.10 | Estudos espectroscópicos proteínas com antibióticos..... | 67 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 70 |
| 3.1 | Objetivo geral: | 70 |
| 3.2 | Objetivos específicos: | 70 |
| 4 | METODOLOGIA | 71 |
| 4.1 | Obtenção do leite | 71 |
| 4.2 | Processamento do leite..... | 71 |
| 4.2.1 | Neutralização do Soro à pH 6.8..... | 73 |
| 4.3 | Precipitação salina (<i>salting-out</i>) | 73 |
| 4.4 | Protocolo de Purificação por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100)..... | 74 |
| 4.5 | Protocolo de isolamento da lactoferrina pelo ponto isoelétrico. | 76 |
| 4.5.1 | Precipitação isoelétrica pelo pI da lactoferrina. | 76 |
| 4.6 | Quantificação de proteínas | 77 |
| 4.7 | Estudos fluorimétricos | 77 |
| 4.8 | Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) | 78 |
| 4.9 | Espectroscopia UV-vis (Medição de absorção UV-visível). | 78 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 79 |
| 5.1 | Processamento do leite bubalino | 79 |
| 5.2 | Fracionamento da lactoferrina bubalina | 79 |
| 5.3 | Purificação por cromatografia líquida (Sephacryl S-100)..... | 83 |
| 5.4 | Eletroforese..... | 87 |
| 5.5 | Purificação isoelétrica pelo (pI) da lactoferrina | 90 |
| 5.6 | Espectroscopia UV-vis: absorção espectral UV-vis da lactoferrina com o antibiótico amoxicilina. | 98 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.7 | Espectroscopia UV-vis: absorção espectral UV-vis da lactoferrina com o flavonoide quercetina (QCT). | 103 |
| 6 | CONCLUSÃO | 109 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 111 |

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

As proteínas do soro e a caseína são frequentemente adicionadas a produtos alimentares devido às suas propriedades agregantes. O soro do leite contém quase a metade dos nutrientes originais do leite sendo rico em componentes tais como: proteínas do soro, vitaminas hidrossolúveis, sais minerais e lactose (POPPI et al., 2010). Desse modo, as proteínas do soro possuem alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais. Os aminoácidos presentes nas proteínas do soro superam as doses recomendadas a crianças de dois a cinco anos e aos adultos, aspecto que torna esta fonte proteica a mais concentrada em aminoácidos essenciais em detrimento às demais fontes de proteínas (TERADA et al., 2009).

As proteínas do soro são complexas misturas de numerosas moléculas, cujas principais são: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas, albumina de soro e lactoferrina (POPPI et al., 2010). Dentre essas proteínas do soro do leite tem se

destacado a lactoferrina por ser uma proteína multifuncional, desempenhando vários papéis biológicos, tais como atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e imunomoduladoras. Como também, a Lf ajuda a estabelecer uma microflora favorável no tecido intestinais, conseqüentemente, promove o crescimento microbiano de bifidobactérias (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009). Além disso, A Lf vem sendo utilizada no desenvolvimento de novas nanoformulações de Lf levando à formação de ingredientes terapêuticos significativos, devido à combinação desta proteína multifuncional com nanomateriais específicos. Onde, vários estudos revelaram que a formação de novas nanoformulações Lf mostrou aumento na captação celular e transfecção de genes, mesmo em uma baixa concentração de Lf em comparação com outras proteínas, como a ligação de Lf a lipossomas encapsulados em DNA e revestimento entérico em Lf (EL-FAKHARANY, 2020).

A atividade antibacteriana da Lf promove a inibição ou retarda o crescimento de bactérias patogênicas para ser humano; entre elas: *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus mutans* e (OCHOA; CLEARY, 2009). Também mostra efeito bacteriostático contra o *Helicobacter pylori* e inibe o crescimento de alguns patógenos resistentes a antibióticos (NIBBERING et al., 2001; SILVA, E. F.; MELO M. B.; GOMES, M. M. O. S.; MACHADO, S. S.; GALDINO, 2021). A atividade antiviral da Lactoferrina foi demonstrada contra um amplo espectro de vírus de RNA e DNA, como vírus Sindbis, citomegalovírus, vírus do herpes simplex, vírus da floresta Semliki, poliomavírus humano, papilomavírus humano, echovírus, vírus da imunodeficiência humana e rotavírus (BERLUTTI et al., 2011; DE CARVALHO et al., 2020; LI et al., 2009a; REDWAN et al., 2014; SILVA, E. F.; MELO M. B.; GOMES, M. M. O. S.; MACHADO, S. S.; GALDINO, 2021). desse modo, a capacidade da lactoferrina de exercer uma potente atividade antiviral, por meio de sua ligação às células hospedeiras e / ou partículas virais, e sua localização nuclear reforça a ideia de que a lactoferrina é um importante tijolo na parede mucosa, eficaz contra ataques virais (VALENTI et al., 2011).

A administração via oral da bLf apresentou uma redução na carga fúngica na pele do dorso (tinha do corpo) e do pé (tinha dos pés) e promoveu a cura da tinha do

corpo. A bLF oral evitou a perda de peso corporal causada pela infecção pelo vírus herpes simplex-1 na pele. Em um modelo de pneumonia murina de infecção pelo vírus da gripe, a bLF oral atenuou os sintomas inflamatórios. A Lf administração por via oral afeta o crescimento e o estado nutricional dos animais, bem como em relação ao metabolismo do ferro, a administração de Fe-bLF aumentou a hemoglobina e os glóbulos vermelhos em ratos anêmicos com deficiência de ferro, enquanto a administração de Fe-bLF em altas doses diminuiu o conteúdo de ferro hepático em camundongos desmamados alimentados com excesso de ferro. É relatado que o LF oral reduz o conteúdo de gordura no soro e no fígado de camundongos, angiogênese mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) em ratos e ganho de peso em bezerros antes do desmame (WAKABAYASHI; YAMAUCHI; TAKASE, 2006).

Estudos vem sendo realizado e investigando as interações proteínas-antibióticos. O estudo realizado para investiga a interação entre bLf e epigalotequina-3-galato (EGCG), demonstrou que a interação do EGCG com a bLf tornou a estrutura da bLf mais compacta, fazendo alterações na estrutura terciária (YANG et al., 2014). Em estudos com flavonoides realizado por Sun et al. (2018), em que a influência da tetraciclina (TCH) nas alterações funcionais da proteína foi estudada através da análise da alteração da hidrofobicidade da superfície bLf e pesquisa das forças de ligação entre bLf e o íon ferro. De acordo com o mesmo autor, os resultados indicaram que a mudança na estrutura e função de bLf foi devido à interação entre bLf e TCH. Estudo que investigou as interações dos flavonoides Luteolina (LTL), Quercetina (QCT) e Naringenina (NGN) com a lactoferrina bovina, mostraram que a (LTL), a (QCT) e a (NGN) podem fornecer guias importantes para a quantidade do composto (por exemplo, dosagem do medicamento) e o projeto de novos compostos (ou drogas), pois a ligação às proteínas desempenhou um papel potencial na distribuição, excreção e efeitos terapêuticos, e tem sido considerada uma das mais importantes características físicas e químicas dos fármacos (HUANG et al., 2018).

Estudos sobre a interação de fármacos isoméricos e bLf não são apenas essenciais para investigar a eficácia de fármacos, revelar o mecanismo farmacocinético e orientar o uso racional de fármacos, mas também tem um papel significativo no desenho molecular de fármacos e na exploração de novos fármacos

(GUO et al., 2017). Mas a reação de ligação da molécula de lactoferrina com a molécula do fármaco varia de acordo com os tipos de lactoferrina.

Tendo em vista as propriedades multifuncionais da lactoferrina (Lf) esse trabalho teve como objetivo de obter uma melhor eficácia de purificação entre as técnicas de isolamento, fracionamento e purificação da lactoferrina bubalina, bem como avaliar a interação da lactoferrina com fármacos amoxicilina e quercetina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite bubalino

O leite contém todos os nutrientes essenciais como proteína, gordura, lactose, vitaminas e matéria mineral para o crescimento normal e desempenhando diferentes funções para os sistemas do corpo. Não só é o alimento mais importante durante a primeira infância, mas também, de uma forma ou de outra, continua a ser usado na dieta normal ao longo da vida. É também o mais versátil de todos os produtos alimentares desejados pelos animais e é um componente das dietas de muitas formas físicas, como queijo, iogurte, sorvete, manteiga, leite em pó e muitas outras formas de leite fluido (KHEDKAR; KALYANKAR; DEOSARKAR, 2016).

O leite de búfala é um produto totalmente natural que pode ser consumido como qualquer outro leite. É um dos produtos mais ricos do ponto de vista composicional e caracterizado por maiores teores de gordura, sólidos totais, proteínas, lactose e cinzas do que o leite de vaca, cabra, camelo e leite humano (AHMAD et al., 2013a). Estudos realizados compararam os parâmetros físico-químicos, como pH, acidez titulável, sólidos totais, cinzas, lipídios, proteínas e lactose de amostras de leite de búfala, vaca, cabra e ovelha e constataram que todos os parâmetros analisados foram superiores em leite de búfala e ovelha do que no leite de vaca e cabra (FANGMEIER et al., 2019).

O alto teor de sólidos do leite de búfala não apenas o torna ideal para o processamento em excelentes produtos lácteos, mas também contribui para uma economia significativa de energia na condução desse processo. Os queijos e iogurtes de leite de búfala são espessos naturais sem recurso à adição de proteínas do leite ou agentes gelificantes como acontece com leites menores. Os laticínios preferem trabalhar com o leite de búfala, pois resultam em uma melhor muçarela com uma textura suave e riqueza de sabores (AHMAD et al., 2013b).

O leite bubalino, o colostro e o leite bovino, contêm componentes bioativos menores, como peptídeos, hormônios e fatores de crescimento, que tiveram efeitos intestinais vantajosos em testes com ratos. O leite bubalino tem concentrações ligeiramente maiores de b-lactoglobulina do que leite bovino, e também é a principal proteína do soro de leite, enquanto o leite humano não contém b-lactoglobulina, que contém aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada, e uma proteína de ligação ao

retinol, que tem o potencial para modular as respostas linfáticas. Além de poder produzir peptídeos antibacterianos, que são liberados após a digestão proteolítica com tripsina e são ativos contra bactérias Gram-positivas (KHEDKAR; KALYANKAR; DEOSARKAR, 2016).

2.2 Proteínas do soro do leite

A utilização industrial desse subproduto tem contribuído para o enriquecimento e desenvolvimento de novos produtos alimentícios, a exemplo cita-se a produção de bebidas lácteas enriquecidas com proteínas e sais minerais de soro de leite. A qualidade biológica das proteínas e o teor de minerais e vitaminas presentes no soro de leite fazem dele um produto atrativo para a indústria de alimentos destinados ao consumo humano e animal. Como resultado da utilização integral do soro de leite, tem-se conseguido a redução da poluição ambiental, vendas adicionais de produtos como proteína de soro, creme de soro, lactose, minerais do leite, além de outros novos produtos à base de soro de leite, como a obtenção de filmes transparentes comestíveis utilizando isolado protéico, que têm sido desenvolvidos (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

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

O soro de leite contém, em média, 93% de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas. A fração protéica contém, aproximadamente, 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactoalbumina e 25% de outras frações protéicas, incluindo imunoglobulinas. As frações do soro são constituídas de: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, caseína do soro, lipoproteínas, lactoferrina, lactoperoxidase e glico-macropéptídeos (**Tabela 1**). Essas frações, no entanto, podem

variar em tamanho, peso molecular e função (SGARBIERI, 2004; SILVA, E. F.; MELO M. B.; GOMES, M. M. O. S.; MACHADO, S. S.; GALDINO, 2021). Apesar de existir uma elevada variedade de proteínas presente no soro do leite, as propriedades dos concentrados protéicos do soro são principalmente relacionadas com as propriedades da β -lactoglobulina.

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

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

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

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

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

O interesse da população por uma vida mais saudável vem crescendo nos últimos anos. Esta tendência está acompanhada do aumento da procura por alimentos com propriedades funcionais. Entre os mais recentes, encontram-se os suplementos nutricionais à base da proteína do soro do leite bovino, mais conhecidos como *whey protein*, cujo efeito, segundo alguns autores, ocorre através do estímulo à síntese protéica devido ao maior aporte de aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004; SILVA, E. F.; MELO M. B.; GOMES, M. M. O. S.; MACHADO, S. S.; GALDINO, 2021).

O *Whey protein* é composto por vários peptídeos, dos quais temos as imunoglobulinas, beta-lacto globulina, alfa-lactalbumina, albumina do soro bovino e glicomacropéptidos. O *whey protein*, uma das mais ricas fontes de precursores da glutatona, é um dos mais utilizados. Bem como, é composto por proteínas extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo. O perfil de aminoácidos das proteínas do soro, principalmente ricas em leucina, pode favorecer o anabolismo muscular (DAVOODI et al., 2016; FISCHBORN, 2009).

Outra característica marcante do *Whey protein* é sua alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada em comparação com outras fontes proteicas, especialmente a leucina, objeto de estudo de investigações devido sua capacidade de ativar vias metabólicas responsáveis pela síntese proteica (ALVES DE SANTANA, 2014; DAVOODI et al., 2016; MINJ; ANAND, 2020).

De acordo com Santos e Nascimento (2019), o perfil de aminoácidos das proteínas do soro, principalmente ricas em leucina, pode, desta forma, favorecer o anabolismo muscular. Além disso, destacam que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro é muito similar ao das proteínas do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção similar às do mesmo, classificando-as como um efetivo suplemento anabólico.

O conceito de proteínas com diferentes velocidades de absorção tem sido, recentemente, utilizado por profissionais e cientistas que trabalham com desempenho físico. Estudos demonstram que as proteínas do soro são absorvidas mais rapidamente que outras, como a caseína, por exemplo. Essa rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, inclusive a leucina, atinjam altos valores logo após a sua ingestão. Pode-se, dessa forma, hipotetizar que, se essa

ingestão fosse realizada após uma sessão de exercícios, as proteínas do soro seriam mais eficientes no desencadeamento do processo de síntese proteica. Além de aumentar as concentrações plasmáticas de aminoácidos, a ingestão de soluções contendo as proteínas do soro aumenta, significativamente, a concentração de insulina plasmática, o que favorece a captação de aminoácidos para o interior da célula muscular, otimizando a síntese e reduzindo o catabolismo protéico (DAVOODI et al., 2016; HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006; MINJ; ANAND, 2020; SANTOS; NASCIMENTO, 2019).

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

2.3 Lactoferrina

2.3.1 Estrutura Da Lactoferrina (Lf)

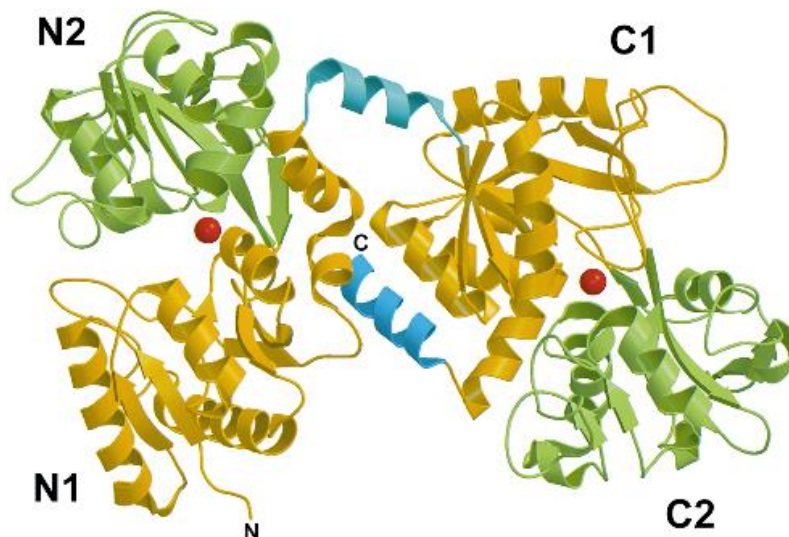
A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína multifuncional com massa molecular de cerca de 80 KDa pertencente à família das transferrinas (Tfs), que tem uma habilidade específica de realizar ligação com o íon ferro (LEGRAND et al., 2008). A Lf é excretada pelas células epiteliais da mucosa e neutrófilos 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; GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

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 1**). 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).

Figura 1. 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).

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, oferecendo uma flexibilidade a molécula (BAKER; BAKER, 2005, 2009).

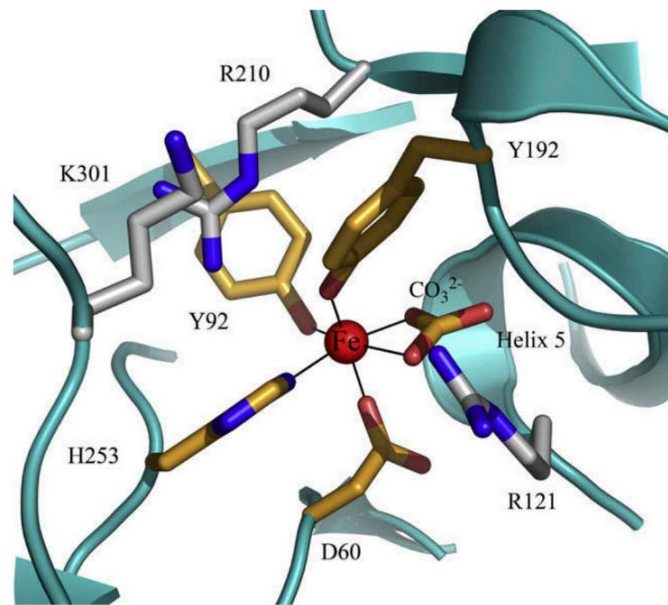
2.3.2 Sítio de ligação ao íon Fe^{3+}

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 2**) 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, 2009, 2012). Estes quatro ligantes de proteína (2 Tyr, 1 Asp, 1 His) fornecem três cargas negativas para equilibrar a carga $3+$ de Fe^{3+} , juntamente com um terminal N em hélice e a cadeia lateral Arg cuja carga positiva equilibra a carga negativa no CO_3^{2-} ânion (BAKER; BAKER, 2005, 2009).

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).

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).

Figura 2. Sítio de ligação ao ferro da lactoferrina. Sítio de ligação do ferro no lobo N: duas tirosinas (Y92 e Y192), um ácido aspártico (D60), uma histidina (H253) e um ânion carbonato (CO_3^{2-}) juntamente com o resíduo de arginina (R121). Dois resíduos básicos atrás do local do ferro, uma arginina (R210) e uma lisina (K301) ajudam a modular a liberação de ferro.



Fonte: Baker; Baker, (2005).

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, 2009a; ROSA et al., 2017) .

2.3.3 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 mostrou 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., 2012).

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).

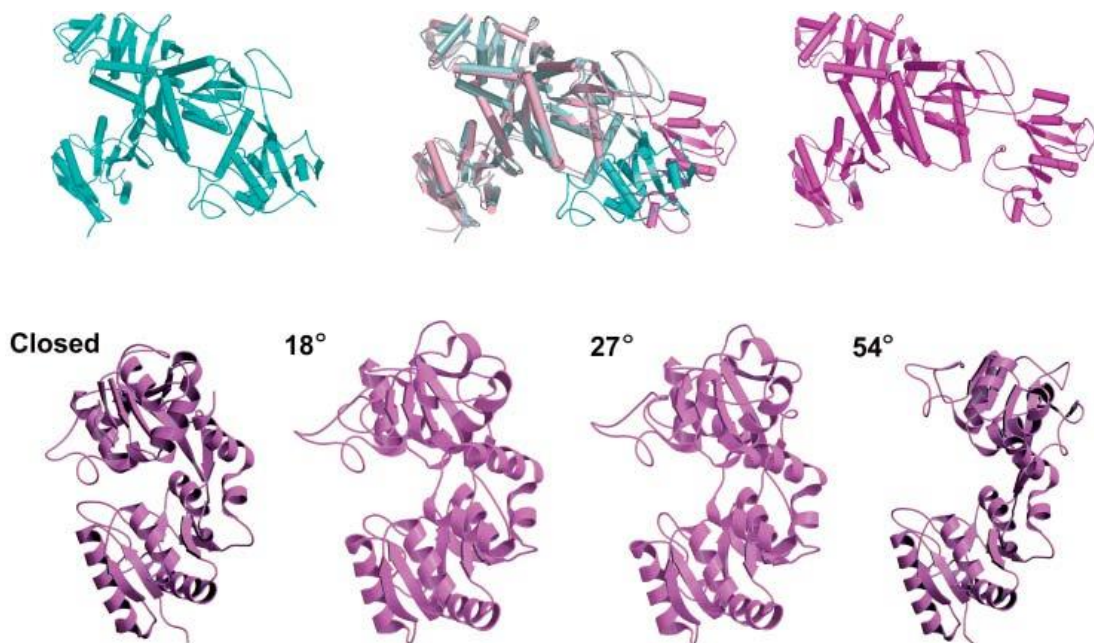
Os estudos cristalográficos em apo-Lf humano mostraram que a liberação de ferro envolve movimentos de domínio do corpo rígido em cada lobo, nos quais um domínio se afasta do outro para abrir a fenda de ligação. Esse movimento é possibilitado por uma dobradiça em dois fios polipeptídicos que correm atrás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

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 3**); uma dobradiça em dois filamentos polipeptídicos que correm atrás do local de ferro medeia 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, 2012). As estruturas cristalinas das formas apo de outros Lfs e Tfs mostram maior diversidade (**Figura 3**). A estrutura cristalina do apo-Lf de

equino provou ter ambos os lobos fechados, enquanto a do apo-Lf de camelo tem ambos os lobos bem abertos (BAKER; BAKER, 2005).

Figura 3. 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 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, 2009; 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).

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, 2009; 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).

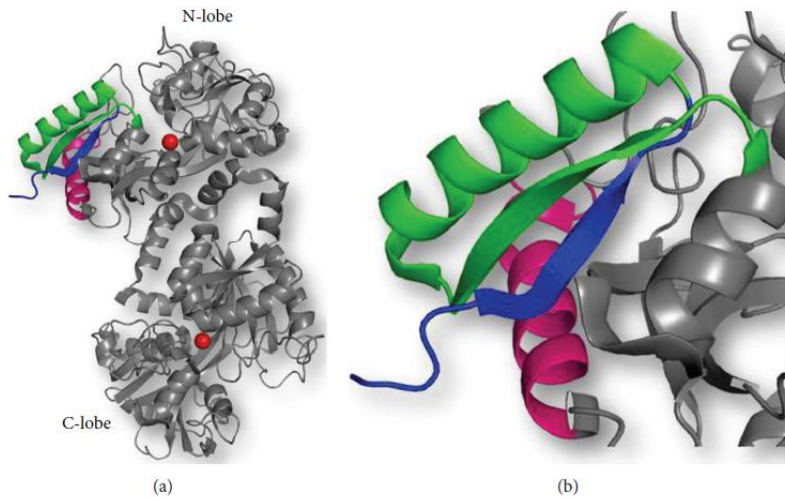
A forma apo livre de metal, no entanto, é flexível e mais propensa a desnaturação térmica e proteólise. Presume-se que íons metálicos se liguem à forma totalmente aberta de apo-Lf, que permite acesso irrestrito. A ligação inicial é a um domínio, mas como a proteína coleta o estado fechado, por meio de flutuações térmicas, ela será bloqueada, pois completa sua ligação a ligantes no outro domínio (BAKER; BAKER, 2009; BAKER; BAKER; KIDD, 2002).

2.4 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 4**). 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 4**). 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).

Figura 4. (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)

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).

2.4.1 Lf 1-11

Lf (1–11) é o oligopeptídeo que inclui os primeiros onze resíduos de aminoácidos da molécula Lf (**Figura 5**). 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 meticilina 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 actoferrina 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).

O problema da resistência aos antibióticos a microrganismos aumenta desproporcionalmente e o controle de infecções está se tornando difícil devido à rápida disseminação desses microrganismos. Terapia combinada de antibióticos com peptídeos antimicrobianos (AMP's) foi sugerido como uma abordagem alternativa para melhorar o resultado do tratamento. Seu mecanismo de ação exclusivo e perfil de segurança tornam os candidatos atraentes do AMP para uso simultâneo ou sequencial em diferentes casos de infecções (BROUWER; RAHMAN; WELLING, 2011; BRUNI et al., 2016).

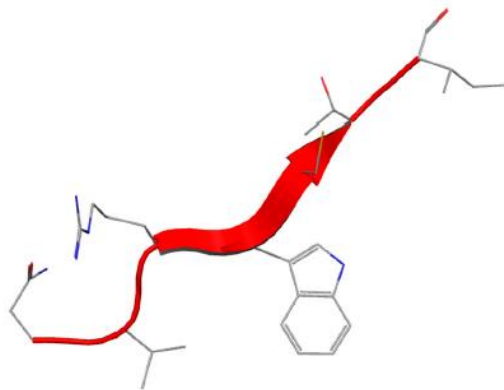
Neste aspecto, foi observado que hLf (1–11), adicionado em concentrações subinibitórias a agentes antifúngicos, como clotrimazol, cetoconazol, fluconazol ou itraconazol, reduz as concentrações inibitórias mínimas desses agentes contra espécies de *Candida*. De modo que, o peptídeo foi altamente ativo contra *Candida albicans* resistente ao fluconazol em concentrações não candidacidas, agiu sinergicamente com o fluconazol contra esta levedura e uma cepa de *C. albicans* sensível ao fluconazol, bem como contra *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C.*

tropicalis (BRUNI et al., 2016). Segundo o mesmo autor, quando esses microrganismos foram expostos a hLf (1-11) por cinco minutos e depois incubadas com fluconazol, foram efetivamente mortas, enquanto nenhuma atividade candidacida foi observada quando foram incubadas primeiro com fluconazol e depois expostas ao peptídeo, mostrando que a atividade candidacida é iniciada pelo peptídeo, enquanto o fluconazol é necessário apenas durante a fase efetora.

A explicação mais provável para o nivelamento dos efeitos antifúngicos do hLf (1-11) é que o peptídeo induz múltiplos processos que contribuem de forma diferente para sua atividade antifúngica (BRUNI et al., 2016).

O mecanismo de ação 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).

Figura 5. 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).

Os efeitos sinérgicos de dois ou mais agentes podem resultar da combinação de diferentes mecanismos de morte. Nesse aspecto, a atividade candidicida do hLF (1-11) envolve a mitocôndria energizada, resultando na síntese e secreção de ATP e produção de espécies reativas de oxigênio. Ambos os mecanismos podem estar envolvidos no aumento do potencial e da permeabilidade da membrana plasmática. Além disso, como foi relatado anteriormente, a C14 α -desmetilase dependente do citocromo P-450, que está envolvida na via biossintética do ergosterol, é o alvo celular do fluconazol (BRUNI et al., 2016).

A importância das três argininas (R2-R4) para a potente atividade antimicrobiana deste peptídeo foi estabelecida quando os peptídeos sintéticos sem os primeiros três resíduos N-terminais foram considerados menos eficazes na morte de bactérias (SINHA et al., 2013). Segundo Sharma et al. (2019), demonstraram por meio da substituição de resíduos que as duas primeiras argininas no terminal N (R2, R3) também são necessárias para a ação antifúngica de hLf (1-11) em *C. albicans*. hLf (1-11) parece ter propriedades imunomoduladoras durante a infecção por *C. albicans*, onde direciona a diferenciação de monócitos em células dendríticas que aumentam a polarização de uma resposta Th17, que é um componente importante da defesa do hospedeiro contra fungos (VAN DER DOES et al., 2012).

2.4.2 Lactoferrampina

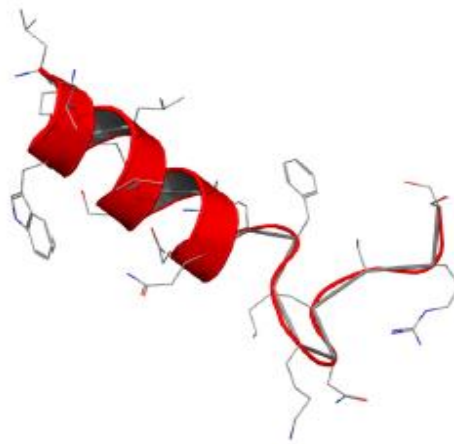
A lactoferrampina (Lfampin) foi recentemente identificada como sendo de potencial interesse por varredura de sequência, com base na característica comum de peptídeos antimicrobianos: uma carga altamente positiva, um domínio hidrofóbico e, portanto, um caráter anfipático (BRUNI et al., 2016). Composta 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 6**) (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 6. 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 | WKLLHRAQEFGRNKSS |
| <i>Capra aegagrus hircus</i> | Cabra | WELLRKAQEKFGKNKSQ |
| <i>Camelus</i> | Camelo | WKLLVKAQEKFGKPS |

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) mostra que a combinação de ampicilina com LFcín 17-30 ou LFampin 265-284 e uma construção quimérica (LFchimera) contendo ambos os peptídeos, 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*.

Os peptídeos lactoferricina (17-30) e lactoferrampina (265-284) não apresentaram atividade bactericida, 40 mM de lactoferrina quimera (uma fusão dos dois peptídeos) inibiu o crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* testado na mesma extensão que o antibiótico gentamicina. Além disso, o efeito cidal de LF-quimera mostrou uma resposta de concentração clara em contraste com a lactoferrina bovina que mostrou maior inibição a 10 mM do que a 40 mM (LEON-SICAÍROS et al., 2009).

A atividade bactericida da LF-quimera, LF, Lfcin, LFampin, Lfcin mais LFampin contra *P. aeruginosa* foram avaliadas, de modo que as concentrações de estudo causaram 50% de redução nas contagens viáveis (valor LC50) para os valores de LC50 de LF, Lfcin, LFampin, Lfcin mais LFampin e LF quimera de 9-4, 2-9, 5-8, 1-4 e 0-9 mol. L⁻¹, respectivamente. Bem como, a atividade bactericida de LF quimera foi significativamente maior contra *P. aeruginosa* do que LF, Lfcin e LFampin e pode ser um novo composto promissor para o tratamento da infecção por *P. aeruginosa* (XU et al., 2010).

2.4.3 Lactoferricina

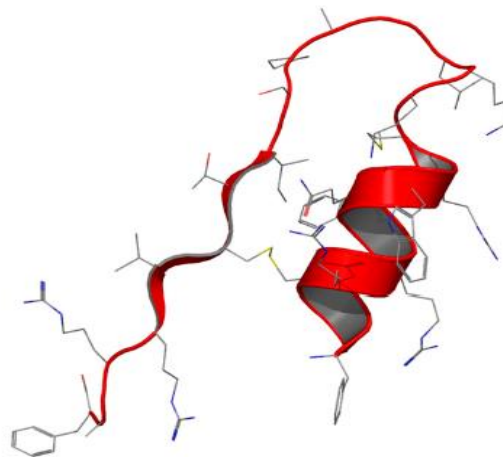
lactoferricina é um peptídeo multifuncional de 25 resíduos gerado após a clivagem da lactoferrina nativa pela pepsina e representa os resíduos de aminoácidos 17-41 na lactoferrina. O péptido lactoferricina é diferente dos outros péptidos descritos, na medida em que contém uma ligação dissulfeto entre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

A bLfcin quanto a hLfcin existem como uma α - hélice anfipática em Lf, mas, após a digestão com pepsina, a primeira é transformada em grampo de folha β anfipática em um ambiente aquoso, enquanto o último (modelo mais volumoso) também possui uma folha β paralela que é perdido após a digestão, preservando a α -hélice (**Figura 7**). A retenção da região α - helicoidal em hLfcin pode estar diretamente

relacionada ao comprimento adicional do peptídeo. A **Tabela 4** mostra a estrutura de Lfcin de diferentes origens. A sequência atual de hLfcin contém este loop, mas, neste caso, uma segunda ligação dissulfeto estende a estrutura geral, que é cerca de duas vezes mais longa que a bLfcin. hLfcin é composto por dois fragmentos correspondentes a 1-11 e 12-47 conectados por uma ponte dissulfeto (BRUNI et al., 2016; HUNTER et al., 2005).

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

Figura 7. Estrutura do peptídeo Lactoferricina.



Fonte: Bruni et al., (2016).

Tabela 4. Comparação da sequência de aminoácidos da lactoferrina para diferentes espécies de mamíferos.

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

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 da lactoferrina foi atribuído à região α -helicoidal anfipática de 11 aminoácidos que está posicionada na superfície externa do lóbulo N da lactoferrina. A prolina na posição 26 (P26) foi considerada essencial para a atividade antibacteriana, e especulou-se ser responsável pela ruptura da região helicoidal e, portanto, a helicidade do peptídeo foi prevista como um aspecto essencial do agente antibacteriano ação deste peptídeo. A lactoferrina foi encontrada para ser produzida no estômago humano, indicando que este peptídeo é definitivamente gerado *in vivo* para a defesa do hospedeiro (SINHA et al., 2013).

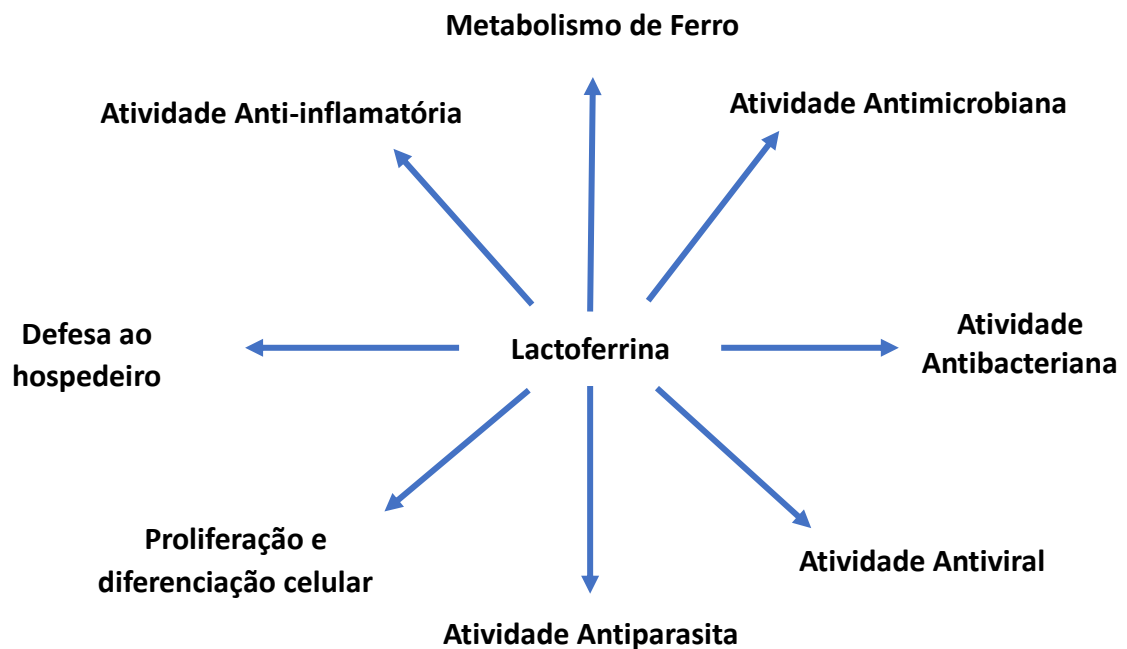
2.5 Funções biológicas da lactoferrina

A lactoferrina (Lf) atraiu muito interesse científico e industrial nos últimos anos devido as suas várias funções biológicas, incluindo atividades bifidogênica – que intensificam o crescimento de bactérias bifidogênicas aquelas que fazem parte da flora intestinal - e atividade antimicrobiana (KARAV et al., 2017), imunomodulatória (LEGRAND et al., 2006a), anti-inflamatória (KANE, 2003), anti-carcinogênica (KARAV et al., 2017), virais e fúngicos *in vitro* (FARNAUD; EVANS, 2003; SINHA et al., 2013) (**Figura 8**). Especificamente, a Lf exibe forte atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos, leveduras, vírus (DRAGO SERRANO, 2006) e parasitas (YAMAUCHI et al., 2006), embora pareça promover o crescimento de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*

(SHERMAN et al., 2004) também exibe atividades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (CONNELLY, 2001) e possui função enzimática como o papel fundamental na manutenção dos níveis de ferro celular no corpo (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

A Lf desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis celulares de ferro no organismo (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Devido as características estruturais da Lf fornecem funcionalidades adicionais como a função da homeostase do Fe^{3+} comum a todas as transferrina. Diferentes estudos mostraram que a estrutura da Lf desempenha um papel essencial nessa atividade (LEGRAND et al., 2008; LI et al., 2009a; MORENO-EXPÓSITO et al., 2018; RBENJAMIN, 2008).

Figura 8. Funções biológicas da lactoferrina (Lf).



Fonte: adaptado de Karav et al., (2017).

2.5.1 Atividade antibacteriana da lactoferrina

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

A Lf inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Listeria monocytogenes* (RIPOLLES et al., 2015), *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (BRANEN; DAVIDSON, 2000), *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (RAMOS-CLAMONT et al., 2010). Também possui efeito bactericida e bacteriostático *in vivo* e em modelos animais contra múltiplas cepas de *Helicobacter pylori* (TITOV et al., 2016). É importante destacar que Lf também atua nas cepas resistentes a antibióticos de *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* resistentes à metacilina, *Klebsiella pneumoniae* resistente à meticilina e *Mycobacterium tuberculosis*, (MORENO-EXPÓSITO et al., 2018; RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005). Também se demonstrou que a Lf é eficaz contra cepas de *Haemophilus influenzae* que podem se ligar à célula hospedeira (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009; JENSSEN; HANCOCK, 2009; MORENO-EXPÓSITO et al., 2018).

A função bacteriostática é devida à capacidade de Lf se ligar aos íons Fe. Como a molécula é encontrada principalmente como apo-lactoferrina (forma livre de ferro) nas secreções, ela tem a capacidade de sequestrar esse metal nos locais de infecção (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005; WARD; URIBE-LUNA; CONNEELY, 2002). O sequestro de ferro de patógenos bacterianos inibe o crescimento bacteriano, limita o uso desse nutriente por bactérias no local da infecção e diminui a expressão de seus fatores de virulência (**Figura 9 a**) (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Acreditava-se que essa fosse a única ação antimicrobiana da lactoferrina por um longo tempo, e foi apoiada por vários estudos demonstrando que apenas a apo-lactoferrina possuía atividade antibacteriana e que essa atividade foi reduzida com a saturação de ferro (JENSSEN; HANCOCK, 2009).

A lactoferrina é capaz de inibir o *Streptococcus mutans* através de um mecanismo independente de ferro, um efeito sugerido como resultado da interação direta da lactoferrina com a superfície celular bacteriana (JENSSEN; HANCOCK, 2009).

A capacidade bactericida de Lf é atribuída à interação direta da molécula, ou parte dela, com a superfície bacteriana (TOMITA et al., 2002). Essa interação foi

observada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (**Figura 9 b**). Estudos com bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus mutans*, *Micrococcus sp* e *Clostridium sp*, mostram que Lf humano e bovino são capazes de se ligar a superfícies bacterianas, graças à sua carga positiva (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005; TOMITA et al., 2002)

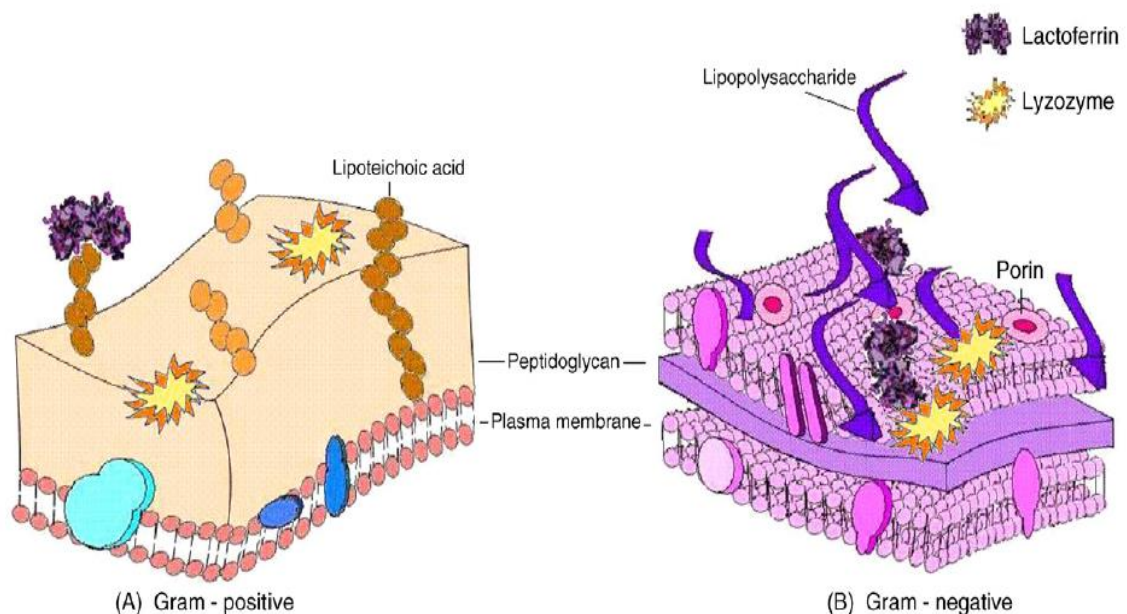
Estudos da estrutura cristalina da lactoferrina demonstraram que a proteína possui grandes manchas catiônicas em sua superfície, facilitando a interação direta com o lipídio A aniônico, um componente do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (BAKER; BAKER; KIDD, 2002; SHAHRIAR; GORDON; SIMKO, 2006). Essa interação pode danificar a membrana bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana externa e resultando na liberação de LPS (JENSSEN; HANCOCK, 2009), ou seja, o terminal N carregado positivamente de Lf impede a interação entre LPS e cátions bacterianos (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e interfere na proliferação agregada em *E. coli* (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

Em bactérias Gram-negativas, como *Vibrio cholerae* e *E. coli*, foi detectada a interação de Lf com a superfície bacteriana, seguida pela liberação de lipopolissacarídeo (LPS), aumento da permeabilidade da membrana e liberação do conteúdo citoplasmático de bactérias (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005; WARD; URIBE-LUNA; CONNEELY, 2002).

O LPS é o componente endotóxico da parede celular das bactérias Gram-negativas, que se liga aos receptores na célula hospedeira, como uma das primeiras etapas da infecção. Portanto, uma das principais estratégias para impedir a ligação de LPS para células eucarióticas, seja a busca de compostos com a capacidade de alterar essa estrutura. Essa ação induz a liberação de LPS da parede celular, de modo que alguns fosfolípidios da membrana interna bacteriana substituam o LPS para evitar alterações na superfície. Essas mudanças, por sua vez, causam um aumento na permeabilidade da membrana com o consequente danos às bactérias. Esse aumento na permeabilidade também facilita para outras proteínas de defesa atacarem as bactérias; lisozima e imunoglobulinas são moléculas que demonstraram ter um efeito sinérgico com a lactoferrina (**Figura 9**) (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005).

A interação entre Lf e LPS ou outras proteínas da superfície também potencializa a ação de antibacterianos naturais como a lisozima, que é secretada pela mucosa em concentrações elevadas junto com Lf (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Também foi demonstrado que o lobo N-terminal de Lf possui uma atividade semelhante à serina-protease. Em *H. influenzae*, Lf é capaz de clivar proteínas em regiões ricas em arginina, e o sítio ativo da protease está situado no lobo N-terminal, atenuando a virulência e impedindo a colonização (HENDRIXSON et al., 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que Lf tem a capacidade de impedir a ligação de certas bactérias à célula hospedeira. Os mecanismos inibidores de ligação são desconhecidos, mas foi sugerido que os oligomanosídeos glicanos de Lf se ligam às adesinas bacterianas, impedindo sua interação com os receptores das células hospedeiras (ROSEANU et al., 2010; WAKABAYASHI et al., 2010).

Figura 9. Mecanismo de ação antibacteriana da lactoferrina (LF). (A) Bactérias Gram-positivas: LF está ligada a moléculas carregadas negativamente da membrana celular, como o ácido lipoteicoico, neutralizando a carga da parede e permitindo a ação de outros compostos antibacterianos, como a lisozima. (B) Bactérias Gram-negativas: LF pode se ligar ao lipídio A do lipopolissacarídeo, causando liberação desse lipídio com consequente dano à membrana celular.



Fonte: González-Chávez; Arévalo-Gallegos; Rascón-Cruz, (2009).

2.5.2 Atividade antiviral

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

A Lf possui forte atividade antiviral contra um amplo espectro de vírus RNA e DNA, como vírus Sindbis (WAARTS et al., 2005), citomegalovírus (ANDERSEN et al., 2001; BELJAARS et al., 2004), vírus do herpes simplex (MARCHETTI et al., 2004), vírus da floresta Semliki (WAARTS et al., 2005), poliomavírus humano (LONGHI et al., 2006), papilomavírus humano (DROBNI; NÄSLUND; EVANDER, 2004), echovírus (AMMENDOLIA et al., 2007), vírus da imunodeficiência humana (PUDDU et al., 1998) e rotavírus (SUPERTI et al., 2001). A maioria desses estudos sugere que Lf inibe a entrada do vírus na célula hospedeira, em vez de agir em sua replicação. A administração de LF também aumenta a atividade das células Natural Killer (NK) e a resposta dos linfócitos TH1, que secretam citocinas que protegem contra a infecção viral (WAKABAYASHI et al., 2014).

A primeira estratégia da Lf de inibição a vírus é ligar-se à partícula viral, impedindo-a de aderir à célula. É o caso do vírus da hepatite C, no qual Lf se liga às proteínas E1 e E2 em seu envelope. Experimentos mostram que, nesse caso, toda a molécula de Lf, em sua conformação nativa, é necessária para que o efeito ocorra. Esse mesmo mecanismo também ocorre contra o rotavírus (SUPERTI et al., 2001). Existem outros vírus nos quais a atividade da Lf é atribuída em parte à sua ligação a algumas proteínas no envelope viral e em parte ao bloqueio de receptores celulares. É o caso do vírus do herpes, adenovírus e vírus do HIV (PIETRANTONI et al., 2003). Observou-se que Lf é capaz de se ligar ao domínio GPGRAF da glicoproteína gp 120 da cápsula do vírus HIV e ao Polipeptídeos III e IIIa do envelope de adenovírus (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005).

Wong et al. (2014), demonstrou que a Lf possui uma poderosa atividade inibitória contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), enquanto alguns fragmentos de LF, como a lactoferricina, exercem uma ação inibitória leve na transcriptase reversa do HIV-1 e na integrase do HIV-1. De acordo com Carthagena

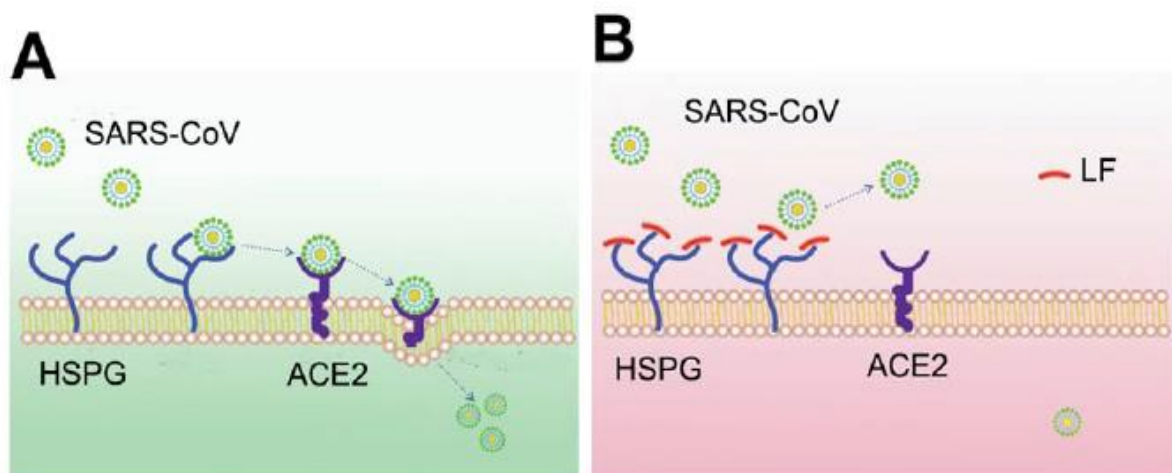
(2011), a LF pode interferir na transmissão do HIV-1 no nível da mucosa, bloqueando sua ligação às células epiteliais e com a transmissão das células dendríticas às células T CD4⁺, duas etapas cruciais na difusão do HIV da mucosa para o tecido linfóide.

Um segundo mecanismo é bloquear moléculas na superfície celular, que o vírus reconhece como receptores ou correceptores. Esses vírus normalmente utilizam moléculas comuns na membrana celular para facilitar sua invasão nas células. Essas moléculas, incluindo os proteoglicanos heparano sulfato (HSPGs), fornecem os primeiros locais de ancoragem na superfície celular e ajudam o vírus a fazer contato primário com as células hospedeiras (BELTING, 2003). Estudo revela que a inibição mediada por LF da infecção por SARS-CoV ocorre através da localização competitiva da LF nos locais de ancoragem de SARS-CoV fornecidos pelos HSPGs. A ligação da LF a HSPGs impediu o contato preliminar entre SARS-CoV e as células hospedeiras e, assim, impediu a entrada subsequente nas células. E que a LF pode exercer suas funções de proteção contra a invasão de SARS-CoV de duas maneiras ao mesmo tempo (**Figura 10**) (LANG et al., 2011).

A vacina BCG (uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin) embora seja essencial para o controle da tuberculose infantil causada pelo patógeno intracelular, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), tem proteção limitada e variável contra infecção primária em adultos ou reinfecção / reativação pulmonar pós-primária (BEHR; SCHWARTZMAN; PAI, 2013; DE JONGE et al., 2005; FLETCHER; MCSHANE, 2006). A falta de eficácia da vacina BCG para prevenir a transmissão de MTB permanece um tópico de intenso estudo.

Um estudo mostrou que a atividade adjuvante de lactoferrina humana recombinante (rHLf) para aumentar a eficácia da vacina BCG foi comparada com LF bovina (bLf), onde a eficácia foi avaliada por comparação com parâmetros imunológicos, resultado histológico e carga bacteriana no tecido ao longo do tempo após uma infecção por aerossol de baixa dose com cepa de Erdman *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Portanto a vacinação com BCG / rHLF levou a uma leve melhora na proteção contra a infecção por MTB nas fases agudas pós-infecção, com redução modesta, mas significativa na progressão inicial da doença (HWANG; KRUZEL; ACTOR, 2015).

Figura 10. Um modelo de entrada na célula SARS-CoV e o papel protetor da lactoferrina na infecção por SARS-CoV. (A) HSPGs desempenham um papel importante no processo de entrada da célula SARS-CoV. Os locais de ancoragem fornecidos pelos HSPGs permitem o contato inicial entre o SARS-CoV e as células hospedeiras e a concentração de partículas virais na superfície celular. O SARS-CoV rola pela membrana celular ligando-se aos HSPGs e faz a varredura em busca de receptores de entrada específicos, o que leva à entrada subsequente na célula. (B) LF bloqueia a infecção de SARS-CoV ligando-se a HSPGs. A expressão de LF pode ser regulada para cima quando o SARSCoV infecta o corpo humano. LF localiza em HSPGs de superfície celular e evita a interação preliminar entre o vírus e as células hospedeiras e o processo de internalização subsequente.



Fonte: Lang et al., (2011).

A Lf é um potencial candidato a adjuvante, pois a proteína realiza a ligação ao ferro presente em todas as secreções mucosas e grânulos secundários de neutrófilos. A Lf é bem conhecido por possuir uma vasta variedade de atividades imunes, incluindo aumentar a atividade de células assassinas naturais, aumentando a expressão de superfície de apresentação de antígenos e moléculas coestimuladoras em macrófagos e células dendríticas e LPS decrescentes induzida inflamação e produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) (DOURSOUT et al., 2013).

2.5.3 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica de amplo espectro da Lf ou suas frações contra leveduras e bolores está bem documentada (SILVA et al., 2013; VAN DER DOES et al., 2012). A atividade antifúngica, inibe o crescimento de diferentes fitopatógenos, como *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* (LAHOZ et al., 2008), de fungos dermatofíticos como *Trichophyton mentagrophytes* (FERNANDES; CARTER, 2017;

SHARMA et al., 2019) e inibe a germinação de esporos e o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em um período de tempo e dose dependente (WANG et al., 2013). Entretanto, a maioria dos estudos sobre a atividade antifúngica de Lf foi realizada com espécies do gênero *Candida*, mais amplamente estudada é a sua atividade em membros das espécies de *Candida*, com *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida albicans* exibindo o maior nível de suscetibilidade, enquanto *Candida glabrata* tem o menor (FERNANDES; CARTER, 2017), provavelmente devido ao fato de a maioria das espécies serem patógenos humanos (ACOSTA-ZALDÍVAR et al., 2016).

Em 1971, realizaram os primeiros estudos com *Candida spp.* e atribuiu o efeito antifúngico da Lf à sua capacidade de sequestrar Fe^{3+} (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009). Em *Aspergillus fumigatus*, o sequestro de Fe^{3+} por apo-Lf mostrou-se importante para a defesa do hospedeiro (ZAREMBER et al., 2007), indicando que o sequestro de ferro pode desempenhar um papel na ação antifúngica de Lf *in vivo* (FERNANDES; CARTER, 2017).

Posteriormente, observou-se que a apo-lactoferrina é capaz de eliminar *C. albicans* e *C. krusei*, alterando a permeabilidade de sua superfície celular, semelhante à forma como ocorre nas bactérias. Nesses casos, também foi observado um efeito maior ao usar a lactoferrina; portanto, acredita-se que o mecanismo de ação seja semelhante ao que ocorre nas superfícies bacterianas (RODRÍGUEZ-FRANCO; VÁZQUEZ-MORENO; RAMOS-CLAMONT MONTFORT, 2005). Alterações na própria superfície celular incluindo vazamento de proteínas, formação de bolhas na superfície, inchaço e colapso celular foram observadas em isolados de *Candida* por microscopia eletrônica de varredura (SHARMA et al., 2019). A liberação celular de íons potássio, acidificação citosólica, alterações no potencial da membrana, acúmulo intracelular de ROS e condensação de cromatina foram detectadas em *C. albicans* após o tratamento com Lf, indicando a indução de um fenótipo apoptótico (ANDRÉS; ACOSTA-ZALDÍVAR; FIERRO, 2016; ANDRÉS; VIEJO-DÍAZ; FIERRO, 2008; KHARE et al., 2004).

O uso combinado de Lf com outras drogas antifúngicas tem sido cada vez mais estudado nos últimos anos. Quando combinado com o fluconazol, várias fontes de Lf foram observadas para aumentar significativamente a atividade inibitória e diminuir a concentração inibitória mínima (MIC) para várias espécies de *Candida*, incluindo o tipo

selvagem e cepas clínicas, e biossíntese e ergosterol e mutantes resistentes ao azol (FERNANDES; CARTER, 2017; VENKATESH; RONG, 2008).

Vários outros medicamentos azólicos, incluindo itraconazol, clotrimazol e cetoconazol, bem como 5-fluorocitosina, demonstraram funcionar sinergicamente com Lf em *C. albicans*. As drogas de polieno anfotericina B e nistatina não exibiram interações com bLf quando testadas em espécies de *Candida* embora anfotericina B e bLf tenham sido encontrados para agir sinergicamente em *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *S. cerevisiae* (FERNANDES; CARTER, 2017).

2.5.4 Atividade antiparasitária

Uma compreensão clara das atividades antimicrobianas de Lf tem sido difícil de ser alcançada porque os mecanismos de ação de Lf e os nichos ecológicos de micróbios geralmente diferem de um organismo para outro. Os mecanismos moleculares da atividade antiparasitária de Lf são ainda mais complexos (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). A maioria dos estudos sobre a atividade antiparasitária de Lf foi realizada *in vitro*, analisando associações moleculares na presença ou ausência de Fe³⁺. Esta atividade também foi demonstrada usando peptídeos derivados da molécula completa (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

A infecção é causada pela *Entamoeba histolytica*, que utiliza mecanismos complexos para invadir a mucosa intestinal e causar colite amebiana. A apo-Lf é a proteína do leite com o maior efeito amebicida contra *E. histolytica in vitro*, pois pode ligar os lipídios na membrana do trofozoíto causando ruptura da membrana e danos ao parasita (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012; GÓMEZ et al., 2007; GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

López-Soto et al., (2010) observaram que a cepa patogênica *E. histolytica* HM1: IMSS foi suscetível à quimera Lf, que é um produto de fusão do peptídeo lactoferrina lactoferricina aminoácidos 17-30 com o peptídeo lactoferrampina aminoácidos 265-284, em curtos tempos de incubação (3 h), enquanto o parasita mostrou sensibilidade moderada LFcina17-30 e LFampina265-284, atingindo apenas a morte de amebas após tempos de incubação prolongados. Curiosamente, as atividades não foram

afetadas em meio contendo ferro, sugerindo que esse elemento não participa do efeito amebicida de LFc_{in17-30}, LF_{ampin265-284} e LF quimera. Provavelmente, o ferro da dieta não influenciará a atividade antiamebica. Assim, a quimera LF pode ser um excelente candidato como antiamebico. Obviamente, é necessário testar a letalidade do LF quimera para ameba em modelos animais, a fim de confirmar seu efeito amebicida *in vivo*.

Estudos mostraram que a lactoferrina bovina (bLf) liga-se aos componentes de *T. brucei* e que o hidrolisado de bLF interrompeu os locais responsáveis pela ligação às proteínas do parasita, causando privação de Fe³⁺ (TANAKA et al., 2004). Outros estudos *in vitro* mostram que a transferrina sérica, bem como Lf humano e bovino, pode se ligar ao parasita intracelular *Toxoplasma gondii*, que causa toxoplasmose e afeta humanos e animais. No entanto, Lf não pode impedir que o parasita entre no hospedeiro. O mecanismo de ação neste caso é a inibição do crescimento intracelular de *T. gondii* nas células hospedeiras (DZITKO et al., 2007; GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009). Em modelos animais, uma lactoferrina reduziu a infectividade de esporozoítos de *T. gondii* e *Eimeria stiedai* (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

O efeito da Lf nos hemoparasitas *Babesia caballi* e *Babesia equi* depende se Lf está ou não ligado a Fe³⁺. Verificou-se que *B. caballi* foi significativamente suprimido por apo-Lf, mas não foi inibido pelos outros tipos de Lf, enquanto nenhum dos tipos de Lf teve um efeito inibitório contra *B. equi* (IKADAI et al., 2005). Se também demonstrar atividade aditiva ou sinérgica com compostos antiparasitários usados clinicamente (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012; LEÓN-SICAÍROS et al., 2006).

2.5.5 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora

A Lf exibe propriedades imunológicas que influenciam as imunidades inatas e adquiridas (LEGRAND et al., 2006). Sua relação com o sistema imunológico é evidente pelo fato de que pessoas com deficiência de Lf congênita ou adquirida têm infecções recorrentes (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). A Lf pode modular a expressão específica e não específica de proteínas antimicrobianas, receptores de reconhecimento de padrões e proteínas relacionadas ao movimento de linfócitos (YAMAUCHI et al., 2006). O papel que a Lf desempenha na regulação das respostas

imunes inatas confirma sua importância como um mecanismo de defesa de primeira linha do hospedeiro contra patógenos invasores, modulando a inflamação aguda e crônica (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012; KRUZEL et al., 2006; LEGRAND et al., 2006). Além de induzir a imunidade sistêmica, a Lf pode promover a imunidade da pele e inibir como respostas alérgicas. Ele induz o sistema imunológico contra alérgenos da pele, causando inibição dependente da dose de migração de células de Langerhans e o acúmulo de células dendríticas nos linfonodos (VAN DER STRATE et al., 2001).

A carga positiva da Lf permite que ela se ligue a moléculas carregadas negativamente na superfície de várias células do sistema imunológico e foi sugerido que esta associação pode desencadear vias de sinalização que levam a respostas celulares, como ativação, diferenciação e proliferação. A Lf é transportada para o núcleo, onde pode se ligar ao DNA e ativar diferentes vias de sinalização (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

A resposta inflamatória é induzida por receptores de reconhecimento de padrão codificados por linha germinal (PRRs) expressos em muitos tipos de células que interagem com seus ligantes de origem exógena ou endógena, nomeadamente Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs), respectivamente. Alguns PRRs compreendem uma grande família de receptores, como os receptores Toll-like (TLRs). Após a ligação do ligante, os TLRs conduzem a vias de sinalização resultando na ativação e translocação do fator nuclear (NF) - κ B para o núcleo (CUI et al., 2014; JONES; NEISH, 2011; KARIN; LAWRENCE; NIZET, 2006).

A NF- κ B modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL) -1, IL-18, interferon tipo I (IFN- α e IFN- β), fator de necrose tumoral (TNF) α , bem como citocinas quimioatraentes (quimiocinas). Outra classe de PRRs inclui receptores semelhantes a Nod (NLRs), alguns dos quais, como NLRP1, NLRP3 e NLRP6, funcionam como sensores ou adaptadores formando os “inflamassomas” (CUI et al., 2014). A ativação de inflamassomas por PAMPs e / ou DAMPs induzem vias de sinalização resultando na ativação da caspase-1 que cliva as pró-formas inativas de citocinas (IL-1 e IL-18) para gerar suas formas ativas. Além de gerar citocinas pró-inflamatórias ativas, alguns inflamassomas regulam a morte celular em

resposta a sinais de perigo microbianos e endógenos (DRAGO-SERRANO et al., 2017).

A Lf é secretada para o meio, onde apresenta atividade anti-inflamatória por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucina (IL) -1, IL-2 e IL -6. A nível celular, a Lf aumenta o número de células natural killer (NK), aumenta o recrutamento de células polimorfonucleares no sangue, induz fagocitose e pode modular o processo mielopoiético (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009).

Os trabalhos com modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* mostram que bLf exibe efeitos moduladores para cima e para baixo no perfil de citocinas Th1 pró-inflamatórias. O papel de bLf na resolução de infecções por meio da modulação de mediadores de inflamação foi documentado em modelos de infecção causada por várias cepas de bactérias enteropatogênicas e parasitas (DRAGO-SERRANO et al., 2017). Além disso, verificou-se que a Lf promove o desenvolvimento de *Bifidobacterium*, um dos principais gêneros de bactérias da flora do cólon usado como probióticos, de forma independente do nível de saturação de ferro de Lf (WAKABAYASHI et al., 2014). Acredita-se que esse efeito ajude a manter a homeostase intestinal.

Estudo demonstrou que com relação à inflamação gástrica, o tratamento com bLf ou hLf como agentes únicos ou em combinação com drogas antimicrobianas, favorece a erradicação de bactérias e protege contra gastrite causada por *Helicobacter pylori* ou *Helicobacter felis* (DRAGO-SERRANO et al., 2017).

Os efeitos da modulação negativa de bLf em citocinas pró-inflamatórias também foram documentados em culturas de células de monocamada Caco-2 infectadas com a cepa invasiva de *Escherichia coli* recombinante abrigando o gene de *Yersinia pestis*; esta cepa é capaz de realizar invasão, mas não multiplicação intracelular dentro das células epiteliais. Neste modelo, apo-bLf, bem como holo-bLf diminuíram os níveis de IL-8 eliciado pela cepa de tipo selvagem de *E. coli* não invasiva, e IL-8, IL-6 e TNF α por *E. coli* invasiva. Além disso, tanto apo- quanto holo-bLf inibiram uma resposta aumentada de IL-8 causada pela cepa invasiva de *E. coli*,

mas os níveis desta citocina permaneceram elevados (DRAGO-SERRANO et al., 2017). Segundo o mesmo autor, as células epiteliais cultivadas tratadas com LPS ou infectadas por *E. coli* HB101 aderente não invasiva sintetizam níveis muito baixos de citocinas pró-inflamatórias, tornando difícil destacar a atividade anti-inflamatória de bLf (YEMETS et al., 2014). Por outro lado, as mesmas monocamadas infectadas por *E. coli* HB101 invasivo (pRI203) expressam significativamente citocinas pró-inflamatórias, cuja síntese é significativamente diminuída por bLf (DRAGO-SERRANO et al., 2017).

Estudos relatam que diferentes monocamadas epiteliais infectadas com vários patógenos facultativos ou intracelulares obrigatórios foram encontradas para expressar citocinas pró-inflamatórias. A adição de bLf a 100 µg / mL diminuiu significativamente os níveis de IL-1β, IL-6, IL-8 e NF-κB (SESSA et al., 2017; VALENTI et al., 2011). A bLf também exerce sua atividade anti-inflamatória em macrófagos inflamados por LPS (CUTONE et al., 2014, 2017; ROSA et al., 2017). Macrófagos humanos, responsivos ao tratamento com LPS, expressam positivamente IL-6, que é significativamente inibida por bLf, o que reduz a inflamação patológica e o dano celular, à semelhança do que foi observado em células epiteliais invadidas por bactérias intracelulares (ROSA et al., 2017).

2.5.6 Atividade anticarcinogênica da lactoferrina

A Lf exerce atividade antineoplásica por diferentes mecanismos de ação de acordo com o tipo de câncer, incluindo: alteração da membrana celular, indução de apoptose, parada do ciclo celular, imunomodulação celular, ação antiangiogênica, inibição de metástases e até necrose celular. No entanto, as bases moleculares da maioria desses mecanismos são mal compreendidas e requerem pesquisas mais aprofundadas (ZHANG et al., 2014). Mas além dos aspectos clínicos gerais, vários mecanismos moleculares subjacentes à capacidade anticâncer do Lf foram revelados, incluindo a modulação do ciclo celular, promoção de apoptose, impedimento da migração e invasividade, bem como imunomodulação (CUTONE et al., 2020).

Um possível mecanismo pelo qual a Lf atua como uma molécula antitumorigênica é através da capacidade inata de ligar ao íon ferro (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009). Na verdade, Fe²⁺, por

meio da reação de Fenton e de Haber - Weiss (reação de Fenton impulsionada por superóxido), é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que desencadeiam e promovem o dano de várias estruturas celulares e macromoléculas, incluindo DNA e RNA (LUZI et al., 2017). A presença de ferro nos tecidos é considerada como aumentando o estresse oxidativo no material genético, dando origem à carcinogênese, e a Lf atua no nível do tecido capturando esses íons (MORENO-EXPÓSITO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2009). No entanto, Luzi et al., (2017) relataram recentemente que Lf bovino livre de ferro (apo-bLf) tem capacidade apoptótica em células cancerosas epiteliais humanas (HeLa).

Evidências foram relatadas para o reconhecimento primário entre Lf e os receptores de superfície das células cancerosas (GUEDES et al., 2018; PEREIRA et al., 2016). A este respeito, a maioria das células cancerosas tem um alto teor de proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs, principalmente sulfatos de heparana e condroitina), bem como de ácidos siálicos, todas essas moléculas sendo conhecidos interatores de Lfs (KÜHNLE et al., 2019). Este reconhecimento bruto pode estar na base da especificidade e seletividade anticâncer Lf. A porção N-terminal de hLf, contendo um grupo único de quatro resíduos de arginina consecutivos (G1RRRR5), demonstrou ser essencial para a interação de hLf com GAGs na linha de células de carcinoma de cólon humano HT29-18-C1, bem como em linfoblástico humano Jurkat Células T. Curiosamente, a região N-terminal de bLf, que mostra uma sequência de consenso diferente (A1PRKN5), é capaz de interagir com GAGs associados à membrana celular de forma semelhante a hLf (CUTONE et al., 2020). Além disso, um estudo demonstrou que a fosfatidilserina, um componente da membrana citoplasmática amplamente representada nas células tumorais, é um alvo crucial para a atividade anticâncer específica de derivados de Lfcin (Lfcin-H) humanos (RIEDL et al., 2015).

A Lf demonstrou um potencial terapêutico notável no tratamento do câncer. Estudos demonstraram que a Lf e seus peptídeos possuem efeito inibitório contra linhas de células de câncer de pulmão (A549), gástrico (AGS), intestinal (HT-29) e de mama (MDA-MB-231, MCF-7) (AMIRI; MORADIAN; RAFIEI, 2015; GIBBONS; KANWAR; KANWAR, 2015; TUNG et al., 2013) língua, esôfago, fígado e colorretal (HEGAZY et al., 2019; SUGIHARA et al., 2017). Enquanto o tratamento com Lf foi

considerado eficiente na inibição do crescimento, metástase e tumor associado angiogênese (ZHANG; LIMA; RODRIGUES, 2014), bem como no reforço da quimioterapia (SUN et al., 2012).

Estudos mostram que a bLf inibiu a expressão de survivin (uma proteína aumenta a taxa de sobrevivência de células cancerosas) e modulou a apoptose de células cancerosas *in vitro* e *in vivo* (GIBBONS; KANWAR; KANWAR, 2015; KANWAR et al., 2015).

Em humanos, a aplicação do Lf em ensaios clínicos para prevenção do câncer é quase impraticável para a maioria dos tumores, porém, investigações sobre seu potencial uso para o tratamento de tipos específicos de lesões pré-cancerosas, a fim de evitar sua transformação em células altamente tumorigênicas, foram realizadas (IIGO et al., 2014).

Um estudo em 2002-2006, realizado pelo grupo de pesquisa Tsuda investigou os efeitos inibitórios de bLf administrado por via oral no crescimento de pólipos adenomatosos colorretais pré-cancerosos em um ensaio clínico realizado em 104 participantes, com idades variando de 40 a 75, no National Hospital do Câncer Center, Tóquio, Japão. Os participantes foram divididos em três grupos, adquirindo 0 (grupo placebo), 1,5 ou 3 g de bLf por dia durante um ano. Os resultados mostraram que, enquanto a dose menor não exerceu efeito significativo, a dose maior foi capaz de impedir o crescimento dos pólipos colorretais, em pacientes com 63 anos ou menos, quando comparados ao grupo placebo. Curiosamente, os níveis séricos de hLf em pacientes que adquiriram 3 g de bLf foram encontrados para aumentar significativamente já após 3 meses de tratamento, consistente com um aumento na atividade dos neutrófilos (KOZU et al., 2009).

Em 2014, o mesmo grupo enriqueceu o estudo ao apresentar dados sobre a correlação entre os parâmetros imunológicos e o tamanho dos pólipos. Os participantes do ensaio com pólipos em regressão apresentaram: i) aumento da atividade das células NK e maior número de células CD4+ nos pólipos, consistente com a ativação da imunidade adaptativa e ii) diminuição do número de neutrófilos polimorfonucleares e aumento do número de células S100A8+ nos pólipos, consistente com a regulação negativa de estímulos inflamatórios (IIGO et al., 2014).

No geral, embora os mecanismos moleculares permaneçam desvendados, o ensaio clínico de Tóquio representa um resultado fundamental, mostrando a eficiência da administração oral de bLf em neutralizar o desenvolvimento do câncer em humanos (CUTONE et al., 2020).

2.6 Técnicas de purificação de proteínas

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

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

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

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

O sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, é frequentemente usado para precipitação salina (*salting-out*) por causa de sua alta solubilidade, que permite soluções de força iônica muito alta, baixo preço e disponibilidade de material puro. Além disso, NH_4^+ e

SO_4^{2-} estão no início de suas respectivas séries Hofmeister e mostraram estabilizar a estrutura da proteína (BURGESS, 2009).

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

2.6.2 Purificação de Lactoferrinas de distintos mamíferos e suas aplicações

As Lf tem sido purificadas de vários mamíferos como purificou a LF de leite humano (MORADIAN; SHARBAFI; RAFIEI, 2014; YUGIS et al., 2015), Lf bovina e do colostro bovino (TITOV et al., 2016; WU; XU, 2009), Lf suína (CLAMONT, et al. 2010), Lf de camelo (RAEI et al., 2015), Lf de cabra (ABBAS; DOOSH; YASEEN, 2015) (**Tabela 5**).

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

A Sephadex G-100 é um meio de filtração em gel usado em cromatografia de proteínas, cromatografia de afinidade e cromatografia de filtração em gel. É um meio de filtração em gel frequentemente citado para dessalinização e troca de tampão de

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

Tabela 5. Resinas utilizadas na cromatografia líquida de purificação de lactoferrinas de equino, camelo, caprino, bovino e humano.

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

Fonte: Autor, (2021).

A lactoferrina humana e bovina tem regiões de peptídeo catiônico fortes que são responsáveis por uma série de características de ligação importantes (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000). A purificação da Lf realizada com Sephadex G-75 (gel – filtração) tem a capacidade de separar moléculas com peso molecular na faixa de 3-80 kDa. Observou-se nesse estudo, a partir do perfil de eletroforegrama que a fração

de purificação usando Sephadex G-75 é capaz de separação de proteínas com peso molecular na faixa de 80 kDa. No entanto, ainda não está completamente purificado devido à separação ser baseada apenas no peso molecular, não na carga de proteína. Neste mesmo estudo, realizou a purificação da Lf com Sephadex G-100 que separa moléculas na faixa de peso de 4-150 kDa, onde mostrou que não havia banda na faixa de 80 kDa. Isso pode ser explicado pois a lactoferrina tem um peso molecular cerca de 80 kDa e a faixa de capacidade de purificação da Sephadex G-100 é 4-150 kDa muito alto em comparação com a Sephadex G-75 logo, a eluição da proteína não foi bem eficaz devido a ampla faixa de purificação da Sephadex G-100. A desvantagem do uso de acondicionamento manual também pode ser prejudicada no processo de purificação, visto que era difícil determinar a liberação de Lf da resina (YUGIS et al., 2015).

Kim et al., (2009) em um estudo realizou a purificação da lactoferrina de equinos por cromatografia em 2 etapas. A cromatografia de lactoferrina de égua em Sephadex G-100 resultou em 3 picos e após análise de SDS-PAGE as frações contendo lactoferrina (15-28 frações) foram reunidas e aplicadas na coluna Toyopeal-AF-Heparin-650m (cromatografia por afinidade) que resultou em 3 picos. Após a análise de SDS-PAGE obteve o peso molecular para a lactoferrina de equino da Mongólia de 81 kDa aproximado ao peso molecular de 82 kDa da lactoferrina.

A purificação da lactoferrina bovina por cromatografia Sephadex C-50 está uma troca iônica gerou uma concentração de Lf determinada de cerca de 2,4 mg / ml. A Lf purificada no presente estudo tinha concentração muito boa e também purificada em uma etapa com atividade biológica e eficiência de purificação de cerca de 90%. O método mencionado, além da simplicidade e rapidez, pode resultar no isolamento da lactoferrina altamente pura (MORADIAN; SHARBAFI; RAFIEI, 2014).

A troca iônica CM Sephadex C-50 é ideal para a captura simples e econômica de proteínas e complexos de grandes volumes de matéria-prima. Essa resina é mais adequada para biomoléculas maiores, como proteínas na faixa de peso molecular de 30 kDa a 100 kDa. Moléculas de alto peso molecular, que são excluídas do grânulo, podem ser adsorvidas até certo ponto na superfície externa. A remoção de detergentes e a purificação de proteínas de soro são aplicações comuns de CM Sephadex C-50 (STELLWAGEN, 2014).

A lactoferrina de cabra foi purificada por cromatografia CM Sephadex C-50 que gerou um único pico no perfil de eluição nas frações de 32-37. No gel SDS-PAGE a mesma fração eluída do pico e comparada o peso molecular de aproximadamente 80 kDa confirmou a pureza e a identidade da lactoferrina de cabra e a concentração estimada a partir da curva padrão foi de 1,8 mg / mL de amostra reconstituída. O que correspondeu a um rendimento de 10,94 mg / L de colostro (VIJAYAN et al., 2017).

2.7 Purificação isoeletricas de mais diversas proteínas

Dependendo do pH, o grupamento amino com carga positiva (forma catiônica) ou o grupamento ácido carboxílico com carga negativa (forma aniônica), podem predominar. Porém, em determinado pH (pH isoeletrico ou Ponto isoeletrico), haverá somente uma forma dipolar (ou seja, positiva e negativa ao mesmo tempo), onde será observada uma neutralidade elétrica na molécula. Estes íons dipolares, são também chamados de **zwitterions** (expressão alemã que ao pé da letra significaria algo como "íons hermafroditas"), predominam no ponto isoeletrico (pI). A forma catiônica predominará em pH abaixo do pI, havendo deficiência de H^+ na solução que varia a carga elétrica pois o grupamento COO^- receberá H^+ . Enquanto que a forma aniônica predominará em pH acima do pI, havendo excesso de H^+ na solução que varia a carga elétrica do grupamento NH^{3+} doará ser H^+ ("Aminoácidos e proteínas pgs 9 a 13 e 17", [s.d.]).

O valor pI exato da aprotéina é uma informação importante que pode ser muito útil para a avaliação dos resultados da análise proteômica. Até agora, os valores pI de proteínas em bancos de dados são geralmente calculados a partir da composição de aminoácidos e, portanto, podem diferir substancialmente dos valores experimentais reais, especialmente no caso de proteínas modificadas pós-tradução (CHMELÍK; MAZANEC; ŠLAIS, 2007).

O princípio da purificação isoeletrica baseia-se na titulação realizada com a adição de um aminoácido no meio a ser titulado, ocorrendo a elevação do pH. Contudo, duas zonas de estabilização (uma em pH ácido e outra em pH básico) indicando que há duas zonas de equilíbrio químico, onde não há a variação do pH mesmo com a adição da base no meio ácido. Essas regiões demonstram que os aminoácidos são responsáveis por uma função tamponante (evitam variações bruscas

de pH). Como a forma dipolar é a que ocorre no pI, toda vez que o pH cai abaixo do valor do pI (acidificação do meio), o aminoácido recebe o H⁺ adicionado através da extremidade COO⁻ tornando-se um cátion. Quando o pH eleva-se acima do valor do pI (alcalinização do meio), o aminoácido torna-se um ânion devido à doação do H⁺ pelo grupamento NH³⁺ (“Aminoácidos e proteínas pgs 9 a 13 e 17”, [s.d.]).

A purificação de proteínas do leite e do soro de leite pela separação do ponto isoeletrico é pouco explorada. Um estudo realizado por Capitani et al., (2005) isolou e purificou a β- lactoglobulina do soro da produção de queijos de minas frescal através da separação do ponto isoeletrico. A lactoferrina é uma proteína básica carregada positivamente com um pI de 8,0-8,5 (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012). Despertando o interesse para estudos de purificação através da separação do ponto isoeletrico da Lf.

2.8 Estudos espectroscópicos com proteínas

Depois de serem distribuídos no sangue circulante, os medicamentos se ligam às proteínas plasmáticas em vários graus. Em geral, essa ligação é reversível e existe um equilíbrio entre as espécies moleculares ligadas e livres. É comumente afirmado que, a menos que haja um sistema de transporte específico, apenas as moléculas livres do fármaco são capazes de cruzar as barreiras da membrana e serem distribuídas aos tecidos para sofrer metabolismo e filtração glomerular. Apenas a fração livre do medicamento é capaz de exercer efeitos farmacológicos e / ou toxicológicos. Assim, a ligação droga-plasma-proteína está criticamente envolvida na farmacocinética da droga (ou seja, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) e farmacodinâmica (efeitos farmacológicos). A ligação da proteína plasmática foi, portanto, considerada, juntamente com a solubilidade, lipofilicidade, ionização e propriedades metabólicas, como uma chave parte dos dados que caracterizam qualquer composto e devem ser avaliados nos estágios iniciais da descoberta do medicamento (VUIGNIER et al., 2010).

Uma nova tendência na pesquisa de interação de proteínas-pequenas moléculas é o uso de diferentes análises espectroscópicas combinadas com métodos computacionais (docking molecular) para obter o modo de interação dos parceiros de ligação, como a espectroscopia de absorvância no UV-visível têm sido usada para

pesquisar as propriedades de ligação de drogas isoméricas ao BLF (GUO et al., 2017; HUANG et al., 2018).

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

Lee et al., (2008) estudou os parâmetros de interação e transferência de energia do ácido ursólico (UA) e o ácido oleanólico (OA) com bLf foram medidos por espectroscopia. Foram investigadas as mudanças conformacionais das moléculas como um todo, bem como a estrutura secundária e a transformação conformacional do bLf no processo de ligação. Os efeitos de diferentes íons nas constantes de ligação também são analisados. Além disso, três resultados de docking molecular com a Orientação de Eficácia com base em dados experimentais são mostrados. Os resultados das experiências em combinação com os cálculos mostraram que existem dois padrões de ligação do triterpenóide pentacíclico ao bLf.

Estudos sobre a interação de fármacos isoméricos e bLf não são apenas essenciais para investigar a eficácia de fármacos, revelar o mecanismo farmacocinético e orientar o uso racional de fármacos, mas também tem um papel significativo no desenho molecular de fármacos e na exploração de novos fármacos (GUO et al., 2017). Mas a reação de ligação da molécula de lactoferrina com a molécula do fármaco varia de acordo com os tipos de lactoferrina. Neste estudo, a lactoferrina bovina (bLf) é escolhida como proteína-alvo devido às suas características universais e estrutura conhecida. Além disso, a estrutura tridimensional do BLF é muito semelhante à lactoferrina humana (HLF) (SUN et al., 2018).

2.9 Estudos espectroscópicos proteínas com Flavonoides

Flavonoides são fitoquímicos encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, caules e flores, bem como chá, vinho, própolis e mel, que são conhecidos

por serem responsáveis pelas cores de muitas flores e frutas e protegem as plantas contra patógenos e insetos e radiação UVB (CUSHNIE; LAMB, 2005).

A ampla distribuição de flavonóides significa que muitos animais, incluindo humanos, ingerem quantidades significativas de flavonóides em sua dieta. Os flavonóides possuem muitas propriedades úteis, incluindo atividade antiinflamatória, atividade estrogênica, inibição enzimática, atividade antimicrobiana, atividade antialérgica, atividade antioxidante, atividade vascular e atividade citotóxica e antitumoral (CUSHNIE; LAMB, 2011). Cada vez mais, os flavonóides são objeto de pesquisas médicas (HUANG et al., 2018).

Um estudo realizado com a Albumina do Soro Humano (HSA) é a principal proteína extracelular presente no plasma sanguíneo, que tem a função central de transportar e distribuir ligantes endógenos e exógenos para diferentes alvos moleculares no corpo humano. Tornou-se importante o desenvolvimento de estudos que caracterizam a interação dos flavonóides com a proteína transportadora HSA, onde investigou a interação dos flavonóides Isovitexina (ISO) e 2-Fenilcromona (2PHE) com a HSA, utilizando técnicas experimentais de espectroscopia de fluorescência, absorvância UV-Vis, dicróismo circular (CD) e infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Em que concluiu que a integração dessas abordagens experimentais e computacionais possibilita caracterizar a formação dos complexos HSA-flavonóides, determinando aspectos físico-químicos como: constantes de afinidade, parâmetros termodinâmicos, número de sítios de ligação, perfil de cooperatividade e resíduos de aminoácidos responsáveis pelas interações proteína-flavonóides (hidrofóbicas e eletrostáticas) (CARUSO, 2012).

Como um composto bioativo com atividades antibacteriana e antioxidante, as micromoléculas de flavonóides podem possivelmente ter um impacto na atividade do bLf em reações inflamatórias. ZHANG, DAI e HUANG (2012), estudaram a implicação biológica da interação entre fibrinogênio e resveratrol e observaram que o fibrinogênio fortaleceu a estabilidade do resveratrol. Li et al. (2009), estudou as interações entre 3 compostos flavonóides e α -amilase, e os resultados mostraram que os 3 compostos flavonóides são inibidores eficazes da α -amilase.

Huang et al. (2018), estudou a interação entre três flavonoides Luteolina (LTL), Quercetina (QCT) e Naringenina (NGN) e lactoferrina bovina (bLf) em pH 7,4 foi investigada espectros de absorção UV-visível. Em que descobriu que a principal força entre o QCT e o LTL com BLF foram as interações de Van der Waals e as ligações de hidrogênio. Bem como, as interações eletrostáticas desempenharam um papel importante no processo de ligação da interação entre NGN e BLF. Sendo o mesmo autor, estes resultados implicaram que a luteolina (LTL), a quercetina (QCT) e a naringenina (NGN) poderiam fornecer guias importantes para a quantidade do composto (por exemplo, dosagem do medicamento) e o projeto de novos compostos (ou drogas).

2.10 Estudos espectroscópicos proteínas com antibióticos

Os produtos farmacêuticos são projetados para estimular uma resposta fisiológica em humanos, animais, bactérias ou outros organismos. Durante a última década, aumentou a preocupação com os efeitos adversos que o uso e o descarte de produtos farmacêuticos podem ter sobre a saúde humana e ecológica (KÜMMERER, 2003).

Com a resistência aos antibióticos atingindo o ponto crítico em muitos hospitais ao redor do mundo e aumentando a resistência em infecções adquiridas na comunidade, há uma necessidade urgente de reabastecer nosso arsenal de agentes anti-infecciosos. Idealmente, isso deve ser na forma de novas classes de agentes antibacterianos, uma vez que a alteração estrutural de drogas para as quais já se desenvolveu resistência raramente fornece uma solução importante. A inibição dos mecanismos de resistência por meio do desenvolvimento de novos adjuvantes também representa uma estratégia importante (CUSHNIE; LAMB, 2011). Diante disso, os estudos sobre o mecanismo de reação entre proteínas e drogas usando técnicas espectrais em combinação com modelagem molecular são uma abordagem comum para estudar a ligação em detalhes (GUO et al., 2017).

Um dos antibióticos bastante estudados na literatura é a amoxicilina, nomeada quimicamente como (2S, 5R, 6R) [[[2R) -2-amino-2 (4 hidroxifenil) acetil] amino] -3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] ácido heptanos-2-carboxílico é um antibiótico beta-lactâmico de espectro moderado usado para tratar infecções causadas por

bactérias gram-positivas sensíveis à penicilina, bem como algumas bactérias gram-negativas (GÜLFEN; CANBAZ; ÖZDEMIR, 2020). Resistente à inativação pelo ácido gástrico. Geralmente é o medicamento de escolha porque é mais rápida e completamente absorvido do que outros antibióticos beta-lactâmicos quando administrados por via oral. Para superar sua sensibilidade à destruição por beta-lactamases, a amoxicilina foi administrada concomitantemente com ácido clavulânico, um potente inibidor da beta-lactamase em preparações farmacêuticas (GIANG; HOANG, 2010).

Em um estudo realizado por Giang e Hoang (2010), utilizaram a amoxicilina em análises espectrofotométricas, sem separação prévia, por meio de técnicas derivadas de UV em combinação com ácido clavulânico ou em misturas farmacêuticas de antibióticos.

As interações entre o cloridrato de ciclofosfamida (CYC) e a aspirina (ASA) com albumina de soro humano (HSA) foram investigados por medição de fluorescência. Onde os espectros de fluorescência das drogas exibiram um apreciável deslocamento hipsocrômico junto com um aumento na intensidade de fluorescência. Como também, o índice de polidispersidade e distribuição de tamanho do complexo proteína-droga foram medidos em várias concentrações dos fármacos pela técnica do potencial zeta, que confirmou os já obtidos resultados experimentais anisotropia, índice de polidispersidade e fluorescência resolvida no tempo. (OMIDVAR; ASOODEH; CHAMANI, 2013).

A presença desses resíduos no leite é consequência da utilização indiscriminada de medicamentos na prática veterinária, não cumprimento do período de carência dessas substâncias, higienização inadequada de equipamentos e utensílios da indústria ou adição fraudulenta para minimizar a deficiência da qualidade higiênica do leite. A presença de resíduos de substâncias químicas é considerado adulterado e impróprio para o consumo, pois representa um risco à saúde pública (MENDES et al., 2008). Estes riscos são manifestados por reações de hipersensibilidade, frequentemente associadas as penicilinas (β -lactâmicos) e as estreptomicinas; indução de resistência bacteriana, associada as tetraciclina; lesões óticas, hepáticas e renais associadas a gentamicina, além de genotoxicidade e anemia aplásica associadas ao cloranfenicol (LOZANO A; ARIAS M, 2008).

Em uma estudo realizado por (VIEIRA et al., 2012) detectou os resíduos de antibióticos em 79 amostras de leite pasteurizado do tipo B de diferentes fabricantes adquiridos em estabelecimentos comerciais do Estado do Paraná, Brasil. A detecção de resíduos de estreptomicina, cloranfenicol, β -lactâmicos, tetraciclina e gentamicina foi realizada utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático. O estudo detectou resíduos de antibióticos em 15/79 (19%), das quais 6/15 (40%) estavam contaminadas por cloranfenicol, 3/15 (20%) por tetraciclina, 1/15 (6,7%) por gentamicina, 3/15 (20%) por estreptomicina e 2/15 (13.3%) por β -lactâmicos e três amostras estavam contaminadas por dois tipos de resíduo simultaneamente.

Mendes et al. (2008) analisaram leite cru comercializado clandestinamente no Município de Mossoró, RN, quanto à presença de resíduo de beta-lactâmicos. Onde todas as 32 amostras analisadas foram negativas. Portanto, as amostras estavam livres de antibióticos ou não continham quantidade maior que o limite máximo resíduo (LMR) permitido no leite.

As diferenças na interação de drogas isoméricas com BLF são estabelecidas usando dados espectrais experimentais e análises teóricas. O objetivo é elucidar o mecanismo de eficácia e toxicidade do fármaco, metabolismo, farmacocinética e força de ligação do fármaco-lactoferrina, etc (GUO et al., 2017).

As propriedades de ligação de drogas isoméricas triterpenóides pentacíclicas, ou seja, ácido ursólico (UA) e ácido oleanólico (OA), à lactoferrina bovina (bLf) foram estudadas por modelagem de molécula, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorvância UV-visível e espectroscopia de infravermelho (IR). Os resultados das medições espectroscópicas mostraram que as duas drogas isoméricas extinguíram fortemente a fluorescência intrínseca do BLF por meio de um procedimento de extinção estática, embora algumas diferenças entre a força de ligação de UA e OA e a transferência de energia sem radiação ocorressem dentro das moléculas. Os resultados das experiências em combinação com os cálculos mostraram que existem dois modos de ligação triterpenóide pentacíclica ao BLF em vez de um modo de ligação governado apenas pelo princípio da energia de ligação mais baixa (GUO et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Purificar a lactoferrina-Lf presente no leite de bubalinos e investigar a interação proteína-fármaco.

3.2 Objetivos específicos:

Realizar a purificação de lactoferrina de bubalinos por fracionamento proteico seguido de técnica cromatográfica.

Realizar a purificação isoelétrica empregando a titulação para a separação através do pI da lactoferrina e outras proteínas presente no leite de bubalinos.

Realizar o monitoramento da separação, purificação e caracterização de lactoferrina de bubalinos através de fluorimetria.

Investigar a interação proteína – antibiótico com espectroscopia de UV-vis de Lactoferrina de bubalinos com a amoxicilina.

Investigar a interação proteína – flavonoide com espectroscopia de UV-vis da Lactoferrina de bubalinos com a quercetina (QCT).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do leite

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

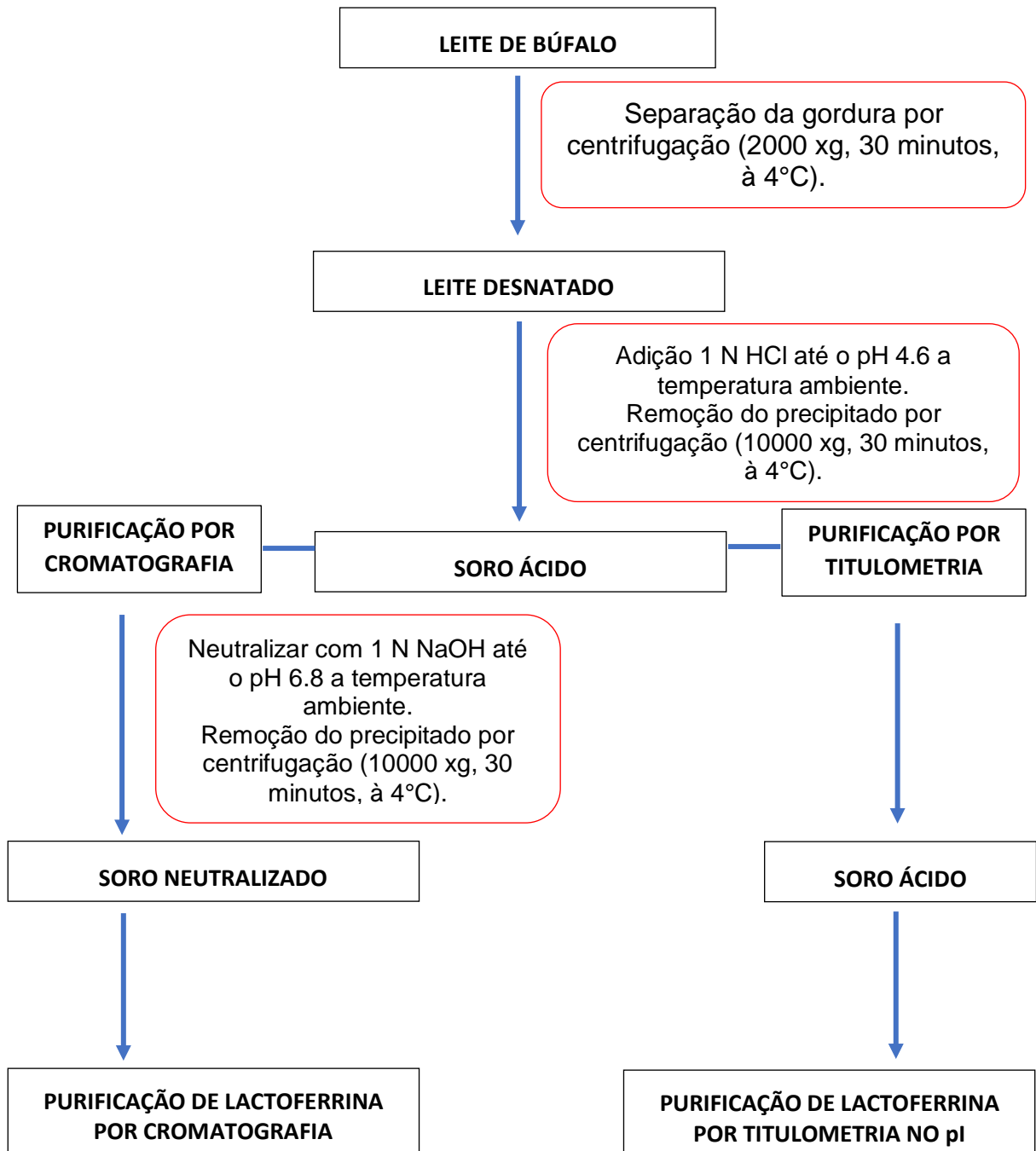
Após a coleta, o leite de búfalo foi armazenado e acondicionado a 4°C até ser congelado no freezer para o posterior processamento.

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

4.2 Processamento do leite

O processamento do leite de búfalo inicia-se com a remoção da gordura por centrifugação (2.000 x g, 30 minutos, 4°C). O leite desnatado obtido na etapa de remoção da gordura foi acidificado até o pH 4.6 (pI da caseína) com HCl 1 N a 25°C e a remoção do precipitado (caseína) ocorreu por centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C) obtendo o soro ácido como sobrenadante e a caseína como precipitado. Nessa etapa 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 (**Figura 11**).

Figura 11. Fluxograma do protocolo processamento.



Fonte: Autor, (2021).

4.2.1 Neutralização do Soro à pH 6.8.

Com o objetivo de remover as caseínas presentes no soro acidificado, bem como a remoção de outras impurezas. O soro ácido foi neutralizado a pH 6.8 com NaOH 1N e a remoção do precipitado ocorreu por centrifugação (10.000 x g, 30 minutos, 4°C).

4.3 Precipitação salina (*salting-out*)

Após a obtenção do sobrenadante neutralizado mediu-se o volume da amostra para adição de sulfato de amônio de acordo com a **Tabela 6**.

Tabela 6. Quantidade de sulfato de sódio para a precipitação salina.

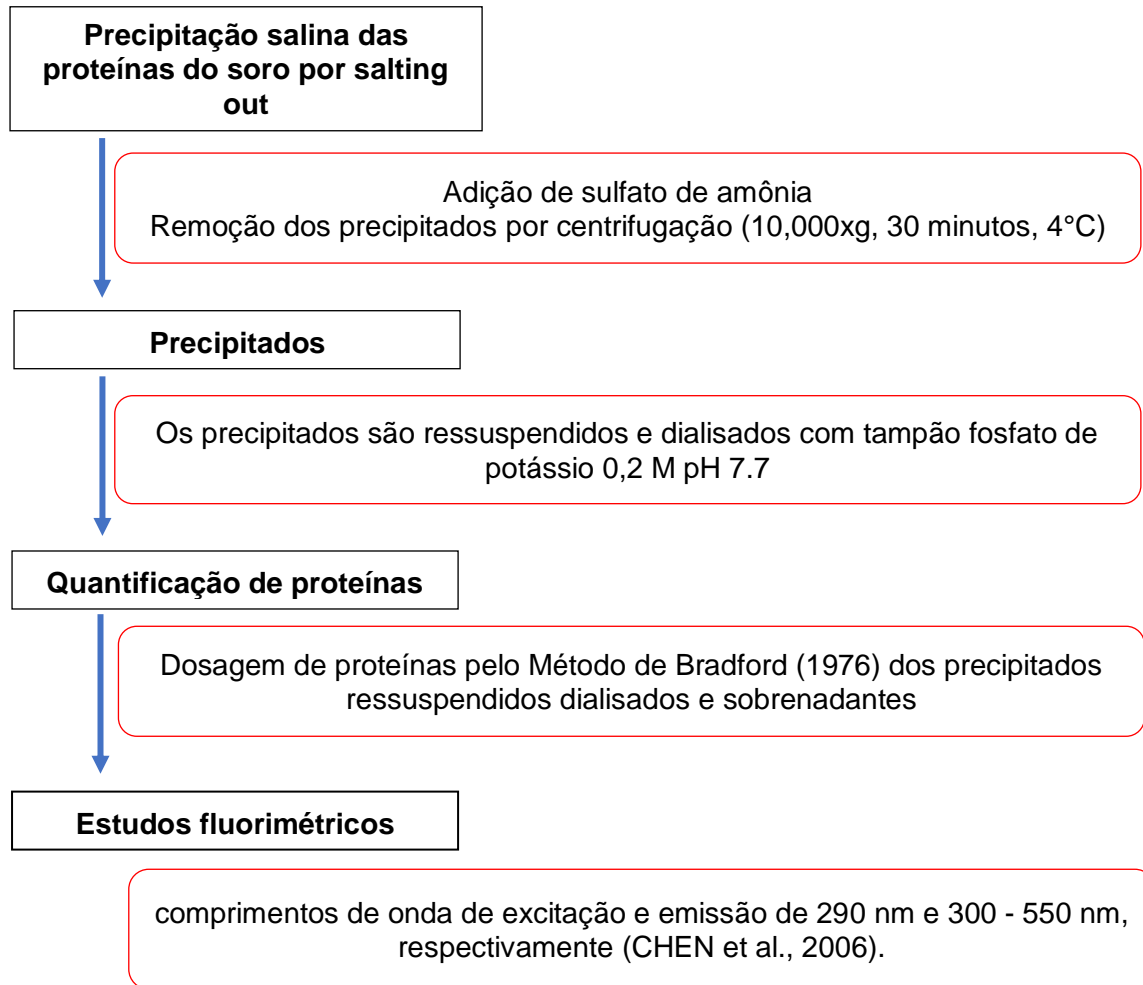
| Initial concentration of ammonium sulfate | Percentage saturation at 0° | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100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

FONTE: WENG, 2007.

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

banho de gelo. O tampão foi trocado três vezes a cada 3 horas e a última troca foi mantida overnight (**Figura 12**).

Figura 12. Fluxograma do protocolo do fracionamento proteico por precipitação salina (*salting-out*).



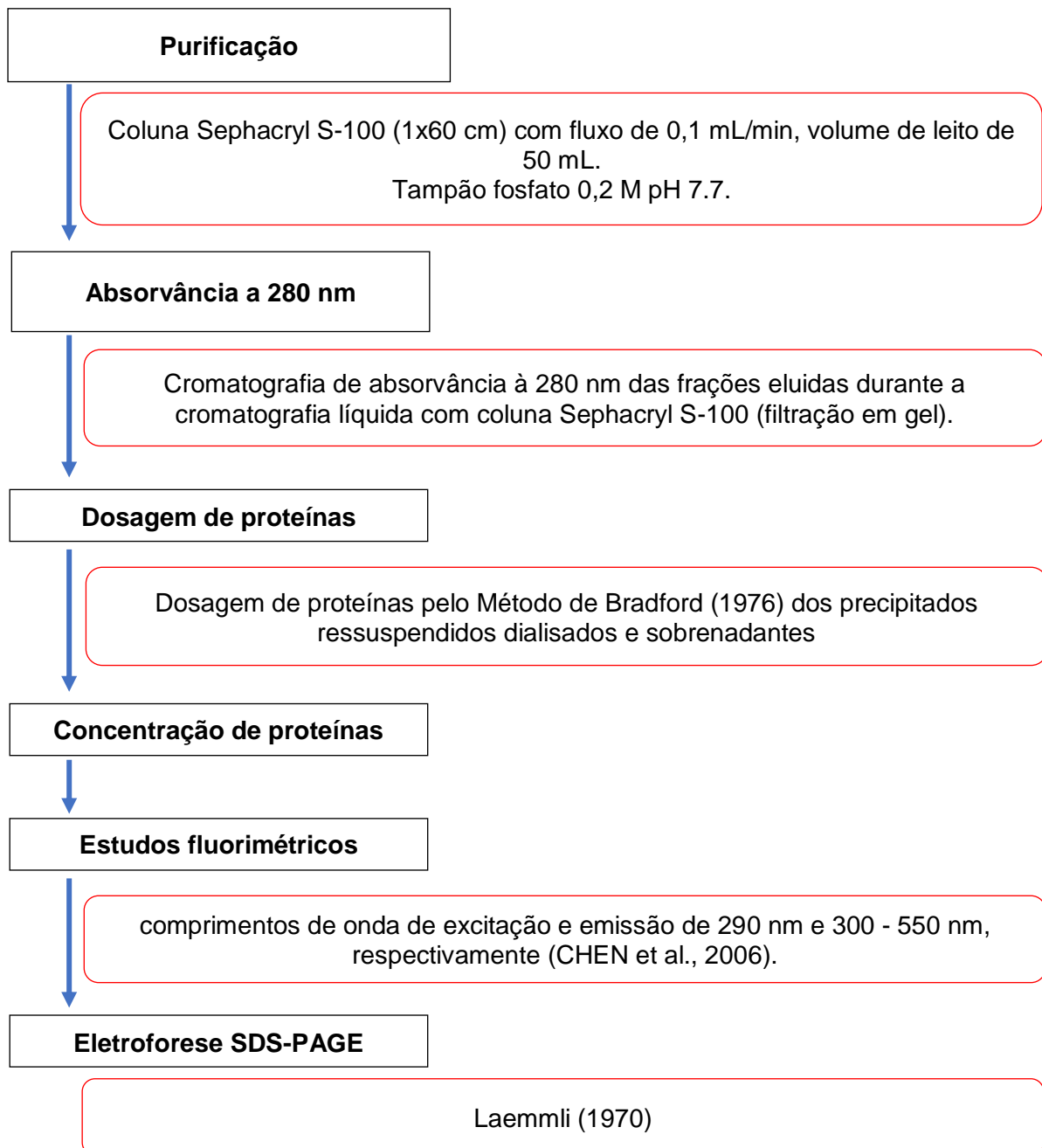
Fonte: Autor, (2021).

4.4 Protocolo de Purificação por cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-100).

Foi aplicada a fração de maior atividade advinda da precipitação salina em uma coluna de exclusão molecular com resina Sephacryl S-100, com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL, nas dimensões de 60x1 cm conectado a um sistema AKTA PURE (GE). Após o equilíbrio da coluna com 1,5 volume de coluna, foi aplicado o volume de 300 µL da fração escolhida, dando início à cromatografia onde foram coletados 2 mL por fração. As frações foram avaliadas a presença de proteína pela absorbância da amostra no comprimento de onda de 280 nm, onde as frações dos

picos de absorvância a 280 nm foram concentradas por tubos concentradores de centrifugas em 15000 x g. Em seguida, as frações eluidas foram submetidas a análises fluorimétricas nas condições de comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300 - 550 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006). A fração com espectro de fluorescência característico da lactoferrina bubalina foi levada à eletroforese (Figura 13).

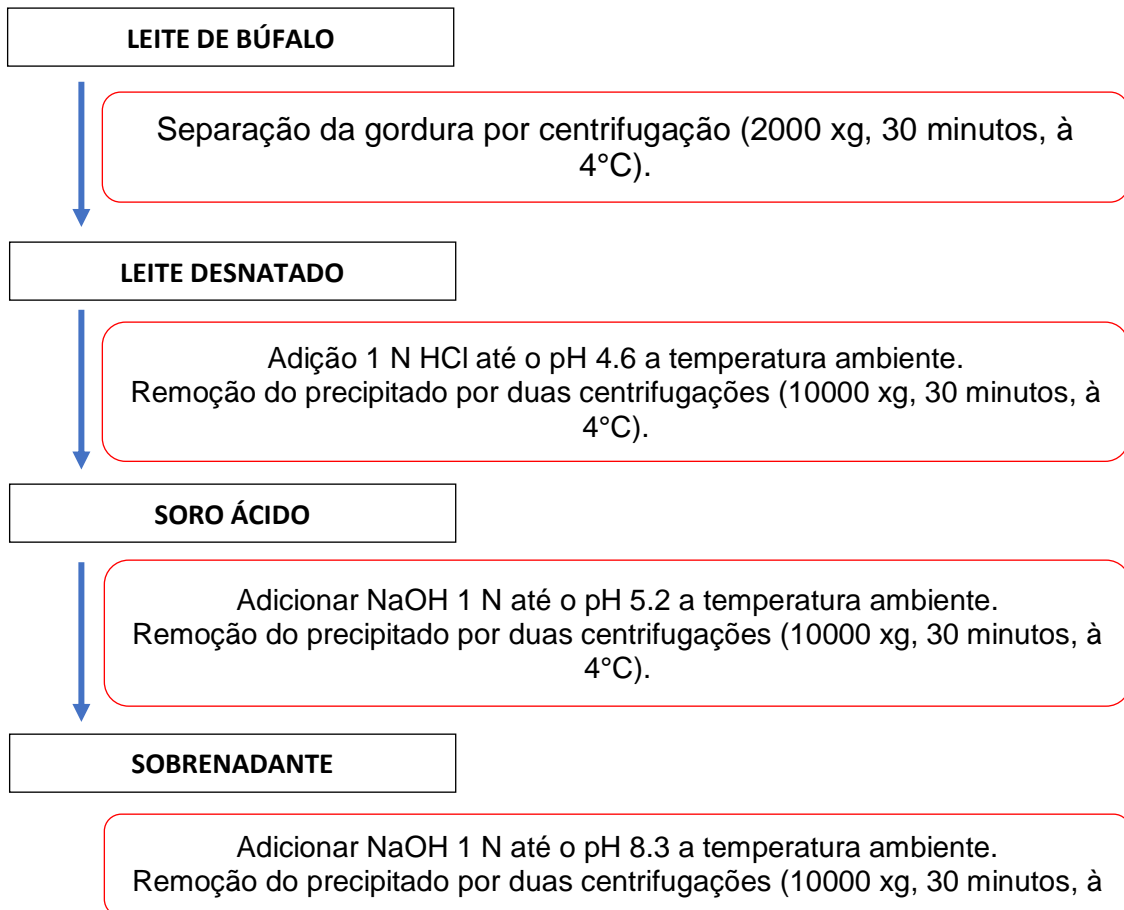
Figura 13. Protocolo de purificação e caracterização.



Fonte: Autor, (2021).

4.5 Protocolo de isolamento da lactoferrina pelo ponto isoelétrico.

Figura 14. Protocolo de isolamento pelo pl de lactoferrina.



Fonte: Autor, (2021).

4.5.1 Precipitação isoelétrica pelo pl da lactoferrina.

O processamento do leite de bubalino inicia-se com a remoção da gordura por duas centrifugações (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 (pl da caseína) com HCl 1 N a 25°C e a remoção do precipitado ocorreu por duas centrifugações (10.000 x g, 30 minutos, 4°C) obtendo o soro ácido como sobrenadante e a caseína como precipitado. Nesse pH ocorre a remoção da caseína e da proteose peptona. em seguida, titulou NaOH 1 N no soro ácido até o pH 5.2, a remoção do precipitado ocorreu por duas centrifugações (10.000 x g, 30 minutos, à 4°C). Nesse pH ocorre a remoção do α -lactoalbumina, sérum albumina e β -lactoglobulina. Logo após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e mediu-se o volume e titulou até o pH 8.3 com NaOH

1 N, a remoção dos precipitados ocorreu por duas centrifugações (10.000 x g, 30 minutos, à 4°C). Os precipitados foram coletados e ressuspensos em um volume conhecido de tampão de acordo com Yoshida et al., (2000). As amostras dos sobrenadantes e precipitados ressuspensos foram submetidas a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford e aos estudos fluorimétricos (**Figura 14**).

4.6 Quantificação de proteínas

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

4.7 Estudos fluorimétricos

Após a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, os sobrenadantes salinos e os precipitados ressuspensos dialisados foram diluídos dos 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 ressuspensos 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 da saída de saída de 5 nm e velocidade de varredura de 240 nm / min, foram realizadas as análises fluorimétricas para a obtenção do espectro de extinção de fluorescência dos 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.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Na purificação por cromatografia, preparou-se 2 géis de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970) em condições redutoras com as seguintes concentrações 8%. Foi misturado as amostras proteicas com tampão de amostra e submersos em banho-maria a 90°C por 5 minutos para desnaturar, em seguida agitou-se com o verX. Foi aplicada uma voltagem constante de 90 V. foi utilizado a Lactoferrina comercial Sigma (16,80 µg) como padrão de peso molecular. A detecção das bandas correspondentes as proteínas foi usado coloração com azul de Comassie (Comassie Brilliant Blue R-250) em 16 horas de agitação e posteriormente lavado com solução descorante (50% metanol e 10% ácido acético). Para a purificação isoeétrica da lactoferrina a detecção das bandas correspondentes as proteínas foram géis de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras com a concentração de 10%.

4.9 Espectroscopia UV-vis (Medição de absorção UV-visível).

A Solução estoque de Amoxicilina foi preparada dissolvendo a quantidade apropriada de amoxicilina em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (0,01 mol. L⁻¹ NaCl) a pH 7,0 para a concentração molar 2,5 x 10⁻³ mol. L⁻¹. O preparo da solução estoque de Quercetina, inicialmente, foi preparada uma solução de dimetil-sulfóxido de concentração 0,3 µmol diluída em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (0,01 mol. L⁻¹ NaCl) a pH 7,0. Em seguida, foi dissolvida a quantidade apropriada de Quercetina na solução preparada para obter a concentração da solução estoque 2,5 x 10⁻³ mol. L⁻¹. Os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Processamento do leite bubalino

No processamento de 490 mL de leite bubalino, obtemos uma massa de gordura 41,806 g, um volume de leite desnatado de 440 mL, a massa de caseína de 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 7**).

Tabela 7. Balanço de massa do processamento do leite de búfalo.

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

Fonte: Autor, 2021.

5.2 Fracionamento da lactoferrina bubalina

Nesta etapa o soro neutralizado bubalino submetido a precipitação salina com sulfato de amônio com os perfis de saturação de (0-20%), (20-40%), (40-60%) e (60-80%). O método adotado aumenta a eficiência da cromatografia líquida, melhorando o fator de purificação da proteína, pois é um método de solubilidade simples, de baixo custo e não acarreta a perda estrutural e da atividade da proteína. Nesta etapa fez-se necessário o controle do tempo e temperatura para todos os fracionamentos do processo. A **Tabela 8** mostra a concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de *salting-out* de (0-20%), (20-40%), (40-60%) e (60-80%). Este método foi monitorado por estudos fluorimétricos de acordo com Chen et al., (2006).

É possível observar na **Tabela 9**, que as amostras do sobrenadante 60-80% e do precipitado ressuspenso 60-80% teve suas concentrações de proteínas elevadas 182,8 mg/L e 26,40 mg/mL, respectivamente. Este valor elevado da concentração de

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

O trabalho de Melo et al. (2018) ainda não publicado, mostra o estudo fluorimétrico para obter o espectro de extinção de fluorescência da Lactoferrina Bovina (0,842 mg/mL) e da Lactoferrina Comercial (Sigma) (0,842 mg/mL) nas citadas por Chen et al., (2006).

Tabela 8. Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de precipitação salina (*salting-out*).

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

Fonte: Autor, 2021.

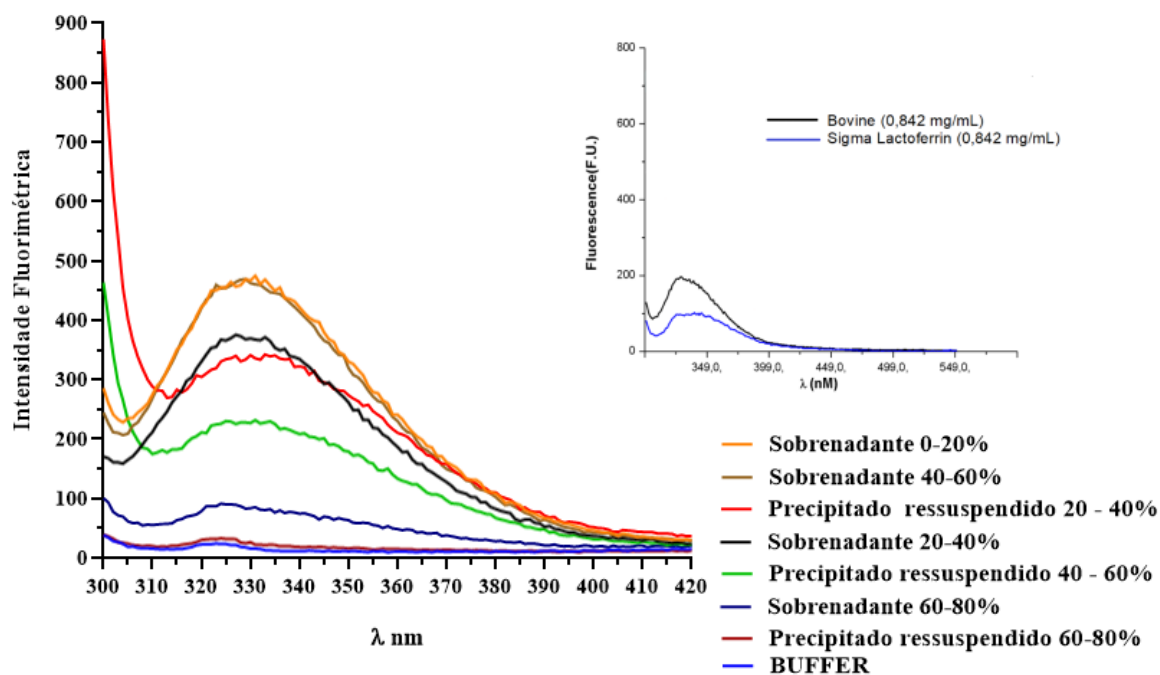
* 500 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7.7.

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

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

Baseando-se nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 290 nm e 300-550 nm relatada por Chen et al., (2006) que estudou a reação de ligação entre lomefloxacin e BLf e no estudo realizado pelo grupo Lactoferrina mostrou que a bovino lactoferrina pura (SIGMA) apresenta um espectro de fluorescência característico na intensidade fluorimétrica e um pico de emissão extinção de fluorescência em 332 nm. É possível observar que a **Figura 15** mostra que os espectros de fluorescência das frações salinas dos precipitados ressuspensos (20-40%) e (40-60%) obtiveram o espectro de extinção de fluorescência e pico de emissão característico de lactoferrina bovina pura (sigma) com de intensidade fluorimétrica de aproximadamente 332 nm nas condições de comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300-550 nm, respectivamente. O mesmo espectro e pico de emissão de emissão de fluorescência foi observado em um estudo realizado por Chen et al., (2006) que detectou o espectro de fluorescência da bovino lactoferrina (bLf) na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm.

Figura 15. Espectro de fluorescência de lactoferrina bubalina das frações salinas dos perfis de precipitação salina (*salting-out*) (pH 7, 290 nm).



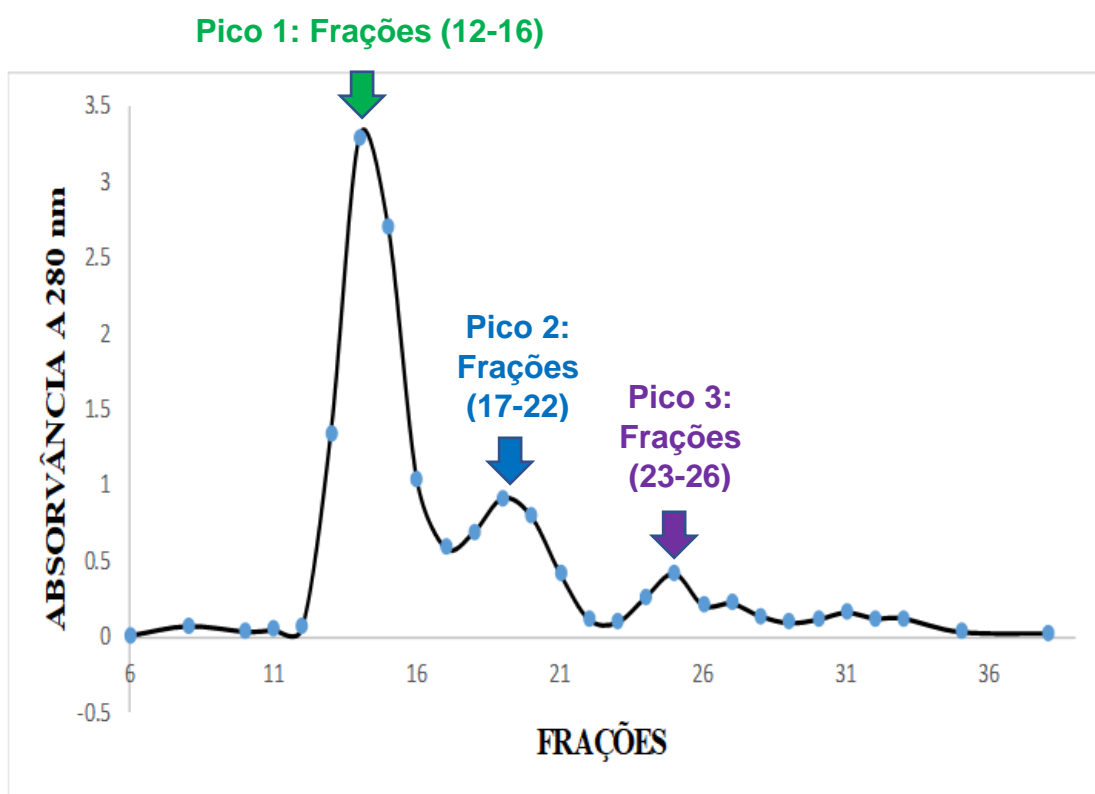
Fonte: Autor, 2021.

O precipitado ressuspensionado (40-60%) foi destinado a etapa de purificação devido a concentração de proteína ser maior em relação a outra amostra.

5.3 Purificação por cromatografia líquida (Sephacryl S-100)

Foi aplicado 300 μ L do precipitado ressuspensionado (40-60%) na coluna cromatográfica Sephacryl S-100 de gel filtração. Foram coletadas alíquotas de 2 mL que foi estimada a presença de proteínas por Cromatográfica de absorvância à 280 nm. A **Figura 16** apresenta um perfil cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspensionado 40 – 60% (300 μ L) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.

Figura 16. Perfil Cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspensionado 40 – 60% (300 μ L) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.



Fonte: Autor, 2021.

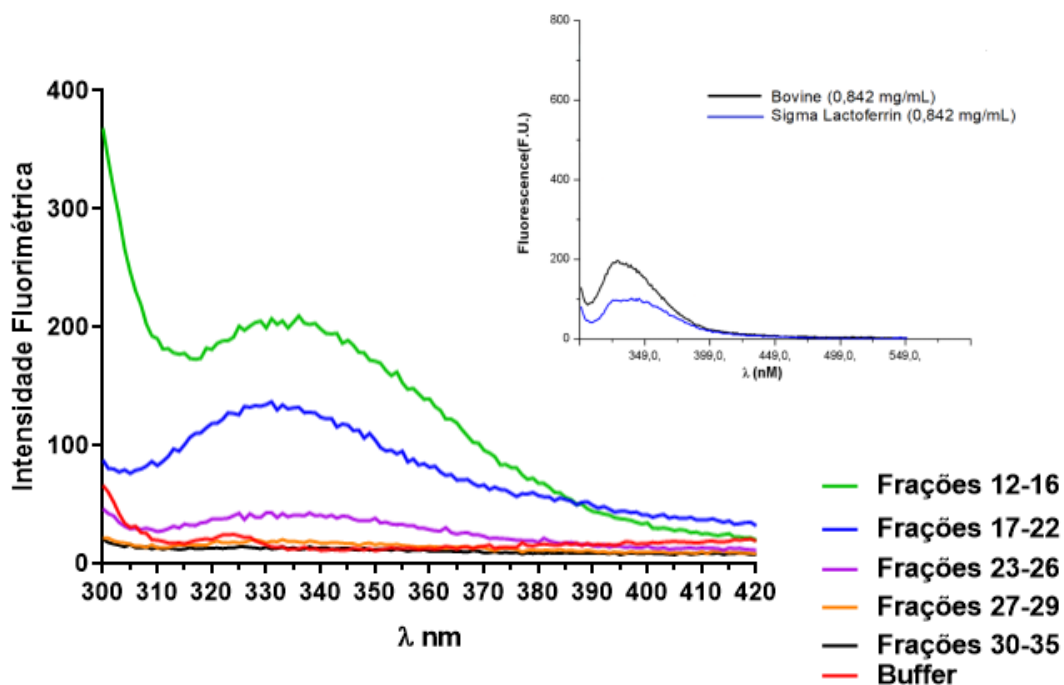
É possível observar que o perfil cromatográfico da absorvância a 280 nm de eluição do precipitado ressuspendido (40-60%) (300µL) durante a eluição da cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100 apresenta três picos de estimativa de proteínas, sendo o pico 1 as frações dos tubos 12 a 16, o pico 2 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 vales 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, para se obter melhor eficiência na purificação de lactoferrina de bubalinos será necessário realizar pequenas modificações na coluna como aumento da coluna, diminuição do fluxo da eluição da fase móvel na purificação de gel filtração.

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 com o fluxo de eluição de 30 mL/h, em que, a fração enriquecida em lactoferrina foi identificada no pico I (15-28 frações) após análise de SDS-PAGE. 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.

Um trabalho de purificação com objetivo de estudar o isolamento e purificação de Lf do colostro de cabra utilizando diversos métodos de cromatografia. De modo que, a purificação foi realizada em três etapas por cromatografia de filtração em gel usando Sephadex G-75 e G-100, para cromatografia de troca catiônica com carboximetil Sephadex C-50 e cromatografia em duas etapas de resina de troca catiônica carboximetil Sephadex C-50 e resina de filtração em gel Sephadex G-75. A Lf isolado nativa foi caracterizado por eletroforese SDS-PAGE. O resultado mostrou que a melhor purificação da lactoferrina caprina (gLf) foi por cromatografia em duas etapas com rendimento de 364 µg / mL e peso molecular de 82 kDa (YUGIS et al., 2015).

As frações que compõem os picos 1 (12-16), 2 (17-22) e 3 (23-26) foram reunidas, e submetidas a estudo fluorimétricos nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 290 nm e 300-500 nm, respectivamente (**Figura 17**) (CHEN et al., 2006).

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



Fonte: Autor, 2021.

É possível observar que as frações reunidas 12 a 16 referentes ao pico 1, apresentou o espectro de extinção de fluorescência característico da lactoferrina comercial (Sigma, USA) com intensidade fluorimétrica de aproximadamente 332 nm baseado no trabalho de Melo et al., (2018). Chen et al., (2006) detectou o espectro de fluorescência da lactoferrina na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm. Em um trabalho similar Sun et al., (2018) obteve o espectro de fluorescência da lactoferrina bovina com intensidade fluorimétrica de aproximadamente 333,6 nm.

As frações reunidas dos 3 picos foram concentradas com concentradores proteicos (marca) por centrifugação (15000 r.p.m., 10 minutos, 4°C). Logo após, as frações reunidas foram submetidas a quantificação de proteínas pelo método de Bradford e aos estudos fluorimétricos nas condições de comprimento de onda de excitação e emissão de 290 nm e 300-500 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006). A **Tabela 9** mostra as concentrações de proteínas das frações reunidas e concentradas dos 3 picos, onde a fração reunida 12 a 16 do pico 1 a concentração de 0,9293 mg/mL.

Tabela 9. Teor de proteínas dos picos após passar em concentradores de proteínas.

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

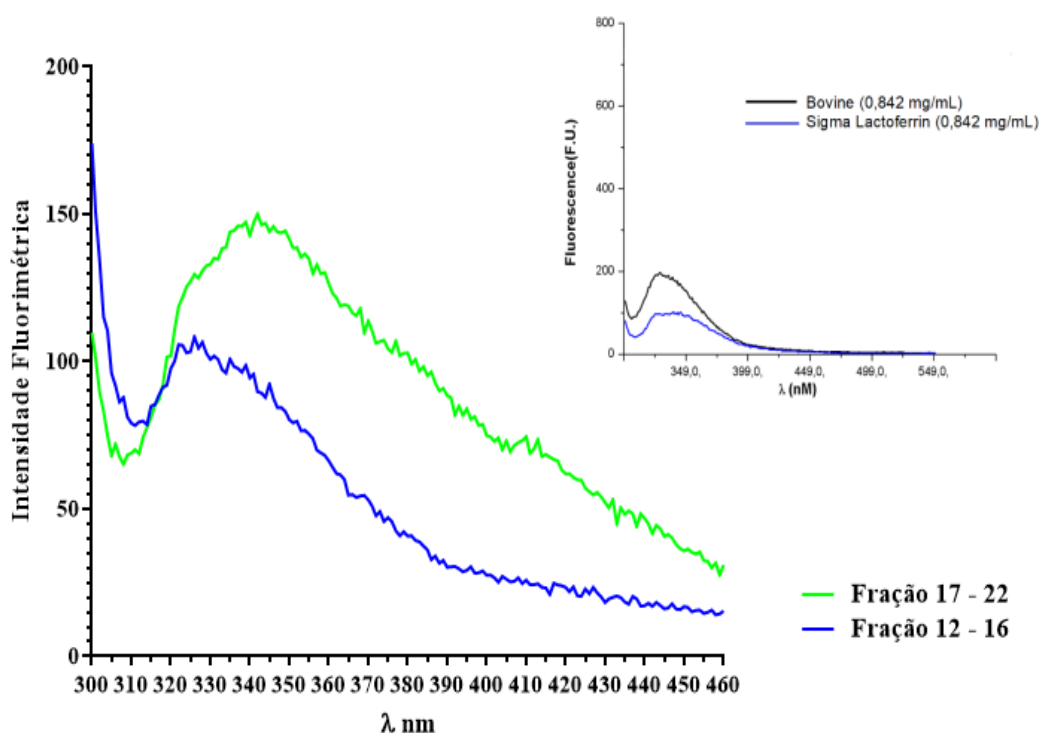
Fonte: Autor, 2021.

Observou-se na **Figura 18**, o Espectros de fluorescência dos picos 1 (frações 12 a 16) e 2 (17 a 22) das frações eluídas pela gel filtração Sephacryl S-100 passadas por concentradores de proteínas. As frações reunidas 12 a 16 referentes ao pico 1 de eluição apresentou o espectro de extinção de fluorescência semelhante ao da lactoferrina com uma intensidade fluorimétrica de 350 nm. Bem como, é possível observar que o espectro de fluorescência referente ao pico 2 (frações 17 a 22) apresentou um espectro de semelhante da lactoferrina, porém o mais expandido e com um pico aproximadamente na região de 350 nm. A expansão do pico é explicada pois as frações referentes a cada pico foram reunidas e como a purificação teve uma eficiência parcial, ao realizar a junção das frações havia presença de outras proteínas eluídas nas frações ocasionando esse deslocamento de pico no espectro de fluorescência.

Chen et al., (2006) detectou o espectro de fluorescência da lactoferrina na região de comprimento de onda $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 290/332$ nm. Em um estudo

realizado por Huang et al., (2018), obteve o espectro de fluorescência de lactoferrina deslocado com intensidade fluorimétrica na região aproximadamente 349 nm. O deslocamento é devido a criação de um ambiente mais hidrofóbico, e com o aumento da polaridade do microambiente ocorre o deslocamento da intensidade fluorimétrica.

Figura 18. Espectros de fluorescência dos picos 1 e 2 após passar no concentrador de proteínas.



Fonte: Autor, 2021.

5.4 Eletroforese

O estudo de varredura realizados dos perfis de eletroforese em gel de poli-acrilamida de 8% em condições redutoras. De modo que, a amostra referente ao pico 1 (frações reunidas 12 a 16) (LfB) foram aplicadas no gel de eletroforeses com as concentrações aplicadas nas concentrações no poço (3) e (3') de 13,42 µg (3) e 15,10 µg, respectivamente. No poço 1 foi adicionada à Lactoferrina bovina SIGMA - (LfS) com a concentração no poço de 16,80 µg (1) da (82 KDa) e essa amostra foi considerada como padrão de peso molecular. Também foi

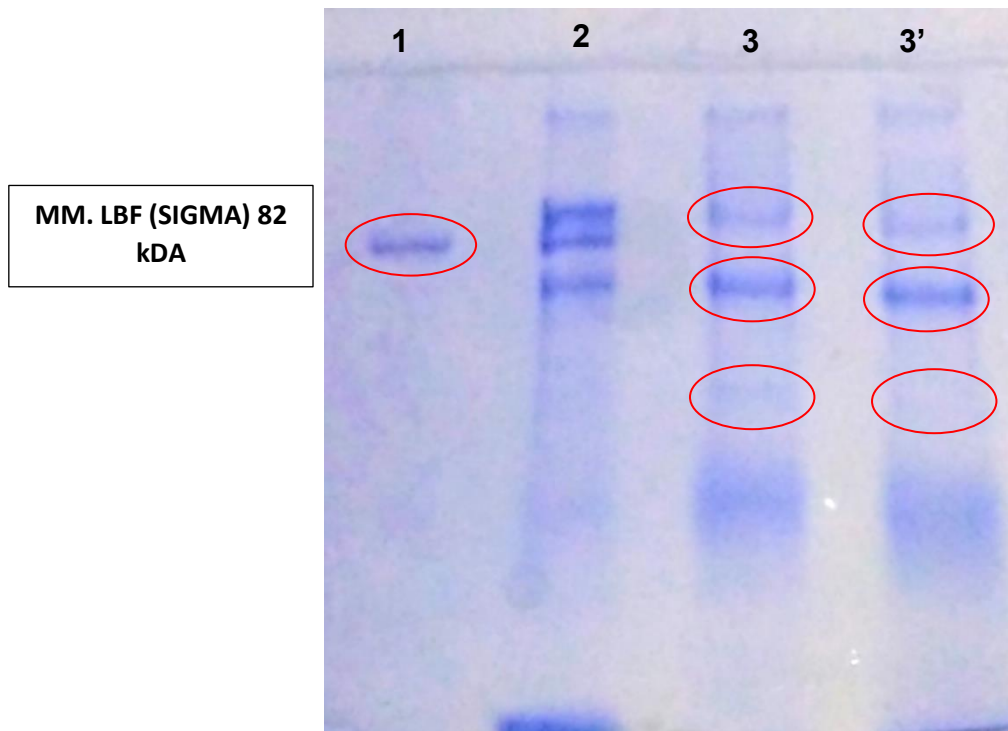
adicionado no poço (2) Sobrenadante Neutralizado – (WfB) com a concentração no poço de 6,06 µg.

É possível observar que o gel de eletroforese SDS-PAGE à 8% obteve uma melhor resolução carga/massa das bandas marcadas pelo corante, que mostra a presença de três bandas de proteínas na canaleta referente a fração da lactoferrina parcialmente purificada (LfB) (**Figura 19**). A canaleta referente as lactoferrina bovina SIGMA (LfS) no poço 1, obteve uma banda de proteína no gel SDS-PAGE à 8%. Diante disso, é possível observar no SDS-PAGE a 8% em condições desnaturantes a Lactoferrina bubalina parcialmente purificada apresenta uma banda com o peso molecular superior a 82 kDa e duas bandas de proteína com peso molecular inferior a 82 kDa quando comparado com a lactoferrina bovina pura (SIGMA) que possui um peso molecular cerca de 82 KDa. Sendo, portanto, a banda de proteína superior a 82 kDa é a lactoferrina bubalina parcialmente purificada em sua forma intacta e as outras bandas de proteínas inferior ao peso molecular de 82 kDa corresponde as subunidades da lactoferrina bubalina que são os fragmentos de lactoferrina do lóbulo N-terminal e do lóbulo C-terminal.

Em um estudo semelhante, a lactoferrina materna purificada da urina de bebês prematuros alimentados com leite humano apresentou as formas intactas (78-kDa) de lactoferrina e os dois fragmentos de lactoferrina de 51 kDa e 39 kDa revelados sob condições desnaturantes por SDS / PAGE, onde foram identificados como o fragmento de lóbulo N-terminal de 39 kDa (resíduos 3-283) e o fragmento de 51 kDa contendo parte do lóbulo N (começando no resíduo 284) e todo o lóbulo C-terminal (HUTCHENS; HENRY; YIP, 1991).

A lactoferrina foi isolada do soro de leite de bubalino da raça Carabao por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca catiônica usando carboximetilcelulose como trocador catiônico. A Lf de Carabao foi eluida aproximadamente 0,27-0,30 M NaCl com uma concentração de 20,05 mg/L e recuperação de 24,97% da amostra de soro de leite. A SDS-PAGE de Lf de cabarao mostrou valor de RF correspondente ao peso molecular de 77.829 kDa (A. A. ANGELES, F. E. MERCA; N. P. ROXAS, (2008).

Figura 19. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas por Sephacryl S-100:(a) gel SDS – PAGE de concentração 8% (LfS: lactoferrina comercial Sigma (16,80 μ g), WfB: Sobrenadante Neutralizado (6,06 μ g) e LfB: lactoferrina bubalina purificada (13,42 μ g; (15,10 μ g)).



Fonte: Autor, 2021.

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

5.5 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 10**).

Tabela 10. Balanço de massa do protocolo de isolamento da lactoferrina de búfalo pelo processo de purificação isoeétrica (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 ressuscitado 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 ressuscitado em 700 µL de tampão e 35 mL de sobrenadante. Na segunda centrifugação ao pH 8.3 obteve um precipitado cuja a massa foi de 1,763 g e um sobrenadante de 30 mL. A **Tabela 11** mostra a concentração de proteínas das frações da purificação isoeétrica da lactoferrina bubalinos.

Tabela 11. Concentração de proteínas nos perfis do ponto isoelétrico 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 ressuspendido à pH 5.2* | 0,104 | 5,05 | 0,005 |
| 2ª Sobrenadante à pH 5.2 | 43 | 4,08 | 0,175 |
| 2ª precipitado ressuspendido à pH 5.2 | 0,106 | 5,73 | 0,009 |
| 1ª Sobrenadante à pH 8.3 | 35 | 4,63 | 0,162 |
| 1ª Precipitado ressuspendido à pH 8.3* | 1,700 | 22,16 | 0,037 |
| 2ª Sobrenadante à pH 8.3 | 30 | 4,51 | 0,135 |
| 2ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 | 0,750 | 3,54 | 0,002 |

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

Fonte: Autor, 2021.

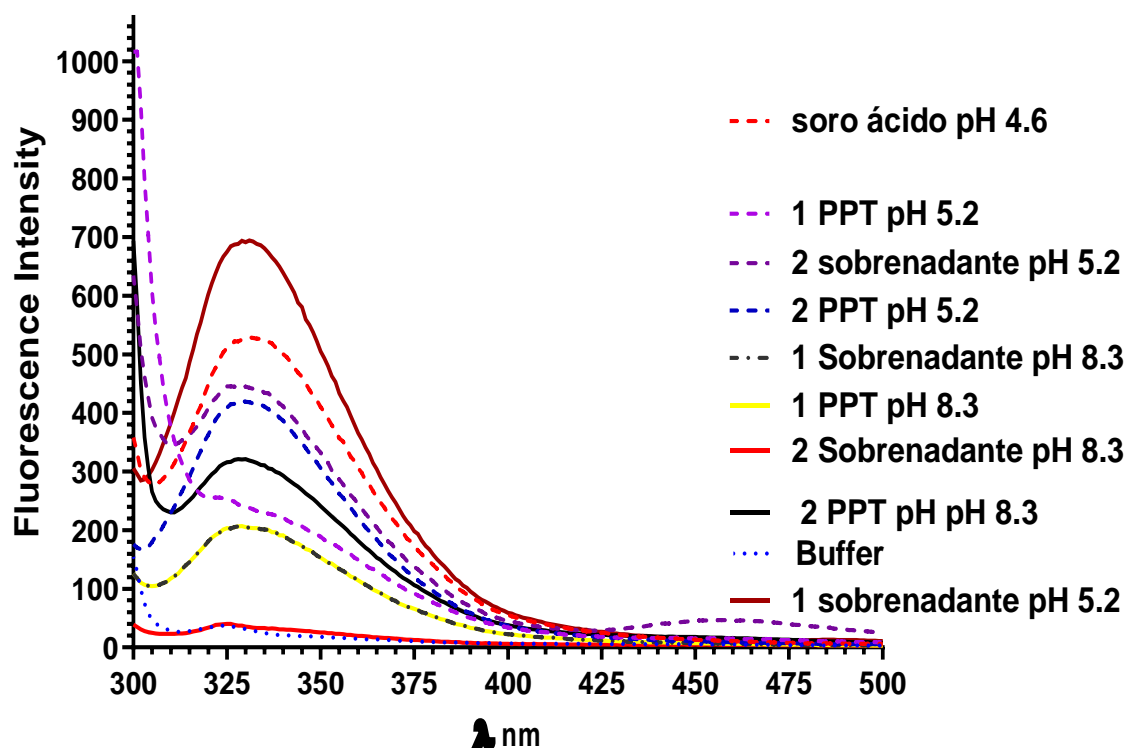
A **Figura 20** mostra o espectro de extinção de fluorescência dos perfis de da purificação isoelétrica pelo pl da lactoferrina bubalina todos os perfis com concentrações padronizadas de 0,842 mg/mL. Baseando-se no estudo Chen et al. (2006) o precipitado ressuspendido obtido na segunda centrifugação 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 ressuspendido a pH 8.3 foi similar no estudo de Chen et al. (2006).

O espectro de extinção de fluorescência da lactoferrina de bubalinos do primeiro precipitado a pH 8.3 não obteve o espectro de fluorescência da lactoferrina bovina Sigma (Sigma, USA) e de intensidade fluorimétrica menor

comparado com o segundo precipitado no pl 8.3. Desse modo, o lactoferrina foi isolada na segunda precipitação no pH 8.3 região do ponto isoelétrico da lactoferrina.

Segundo Steijns e Van Hooijdonk, (2000), os valores teóricos de pl 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 pl 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 20. Espectros de fluorescência dos perfis da titulação do soro ácido no isolamento da Lf pelo pl.



Fonte: Autor, 2021.

A **Figura 21** apresenta o estudo eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de concentração 10% em condições redutoras dos perfis de

purificação isoeétrica pelo pl 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 µg no poço, a canaleta 2 é o soro ácido à pH 4.6 na concentração 90 µg no poço, o número (3) é referente ao 1ª sobrenadante pH 5.2 com a concentração de 90 µg no poço, número (4) é referente ao 1ª precipitado ressuspendido à pH 5.2 com a concentração de 90 µg no poço, número (5) é referente ao 2ª sobrenadante à pH 5.2 com a concentração de 90 µg no poço, número (6) é referente ao 2ª precipitado ressuspendido à pH 5.2 com a concentração de 90 µg no poço, número (7) é referente ao 1ª sobrenadante à pH 8.3 com a concentração de 90 µg no poço, número (8) é referente ao 1ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 com a concentração de 90 m µg no poço, número (9) é referente ao 2ª sobrenadante à pH 8.3 com a concentração de 90 µg no poço e número (10) é referente ao 2ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 com a concentração de 90 µg no poço. Foram aplicadas no gel de eletroforeses SDS-PAGE iguais as concentrações de amostras de 90 µg no poço. No poço (1) foi adicionada à Lactoferrina bovina SIGMA (82 KDa) essa amostra foi considerada como padrão de peso molecular.

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 observar o grau de pureza, de modo que a purificação obtida foi de eficiência parcial.

Quando comparamos a canaleta (1) (lactoferrina Bovina Comercial (SIGMA, USA), utilizada como padrão de peso molecular e referencial de lactoferrina, com a canaleta (8) (1ª precipitado ressuspendido pH 8.3) é possível observar na canaleta 8 não apresenta a banda de proteína na altura correspondente a banda de proteína da lactoferrina bovina comercial Sigma (canaleta 1). Logo, podemos firmar que a lactoferrina não precipitou na primeira etapa da purificação isoeétrica no pl 8.3, 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 foi isolada na segunda centrifugação em seu ponto isoelétrico (pI). Logo, a lactoferrina bubalina foi parcialmente purificada em seu ponto Isoelétrico que varia de 8,0 – 8,5.

Em seguida foi realizada uma segunda eletroforese onde compara aos precipitados ressuspensos e sobrenadantes na região de pI da lactoferrina com o lactoferrina bovina comercial (SIGMA, USA) e o peso molecular. De modo que, na **Figura 22** é possível observar no gel de eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e concentração a 10% os perfis de purificação isoelétrica pelo pI da lactoferrina.

A aplicação das amostras no gel de eletroforese (**Figura 22**) ocorreu na canaleta número (1) que 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 ressuspensado 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 ressuspensado 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) Referente ao 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 essa a mesma banda foi observada na canaleta 5, o 2ª precipitado ressuspensado 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. Bem como, é possível observar a presença de outras proteínas.

A presença de outras bandas de proteínas com o peso molecular inferior a 75 kDa no SDS-PAGE são correspondes a albumina do soro (69 kDa), β-

Lactoglobulina (18,4 kDa) e α -lactoalbumina (15 kDa). Demonstrando o isolamento parcial da lactoferrina de bubalinos pela purificação isoelétrica.

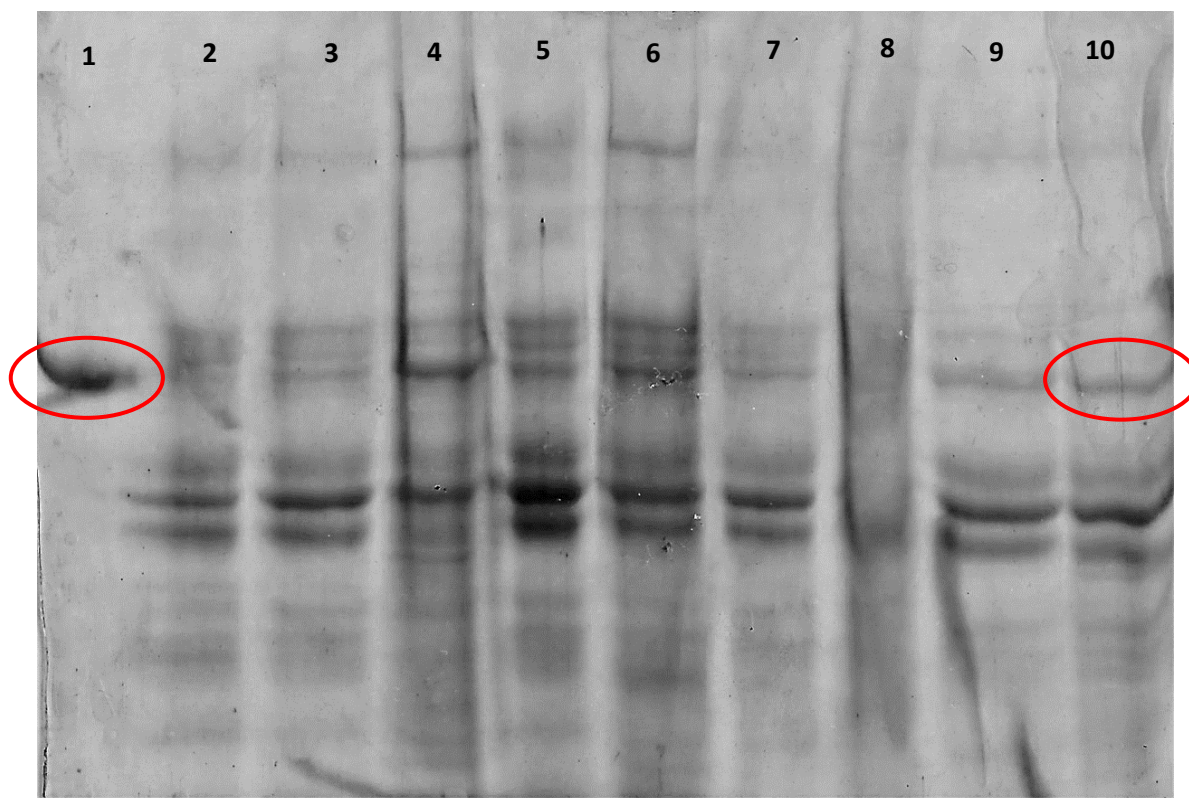
De acordo com Capitani et al. (2005), a maior parte das interações que ocorrem no processo de coacervação complexa é do tipo eletrostática, por isso é necessário que os valores de pH do meio de reação estejam abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas do soro, onde se apresentam suficientemente protonadas, para que ocorra a reação de complexação com polissacarídeos aniônicos. Sabe-se que o pI da β -lactoglobulina (β -Lg) encontra-se na faixa de 5,2, e da α -lactoalbumina (α -La) entre 4,2 e 4,5 (CAPITANI et al., 2005). Segundo o mesmo autor, no pH 3 houve diferença significativa entre as médias de concentração de proteínas nos sobrenadantes ($p > 0,05$), portanto, optou-se por este valor de pH para precipitar a fração de proteínas totais por utilizando o polissacarídeo carboximetilcelulose sódica (PT/CMC). De modo que, na faixa de pH 3 ocorreu máxima precipitação de proteínas, provavelmente houve maior balanço entre as cargas negativas no carboidrato e cargas positivas nas proteínas. No pH 3, os sítios de ligação das proteínas, carregados positivamente, são grupos amino, que realizam ligação com os grupos carboxílicos protonados da goma.

No estudo de purificação realizado por Bassan (2012), mostrou que a diferenças protéicas entre o soro bubalino e bovino realizou-se uma SDS-PAGE (10%) e através dos resultados obtidos ficou confirmada a presença de uma fração protéica no soro bubalino que não está presente no soro bovino e apresenta massa molar situada entre 20,1 e 30,0 kDa. Entretanto, quanto às demais proteínas, o soro do leite de búfala é muito semelhante ao soro do leite bovino, ou seja, proteínas com massas molares entre 97 e 66 kDa (imunoglobulinas e soroalbumina) e entre 20,1 e 14,4 kDa (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Há também uma proteína massa molar de aproximadamente 30 kDa presente nas duas espécies, mas que no soro bovino está mais evidente.

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

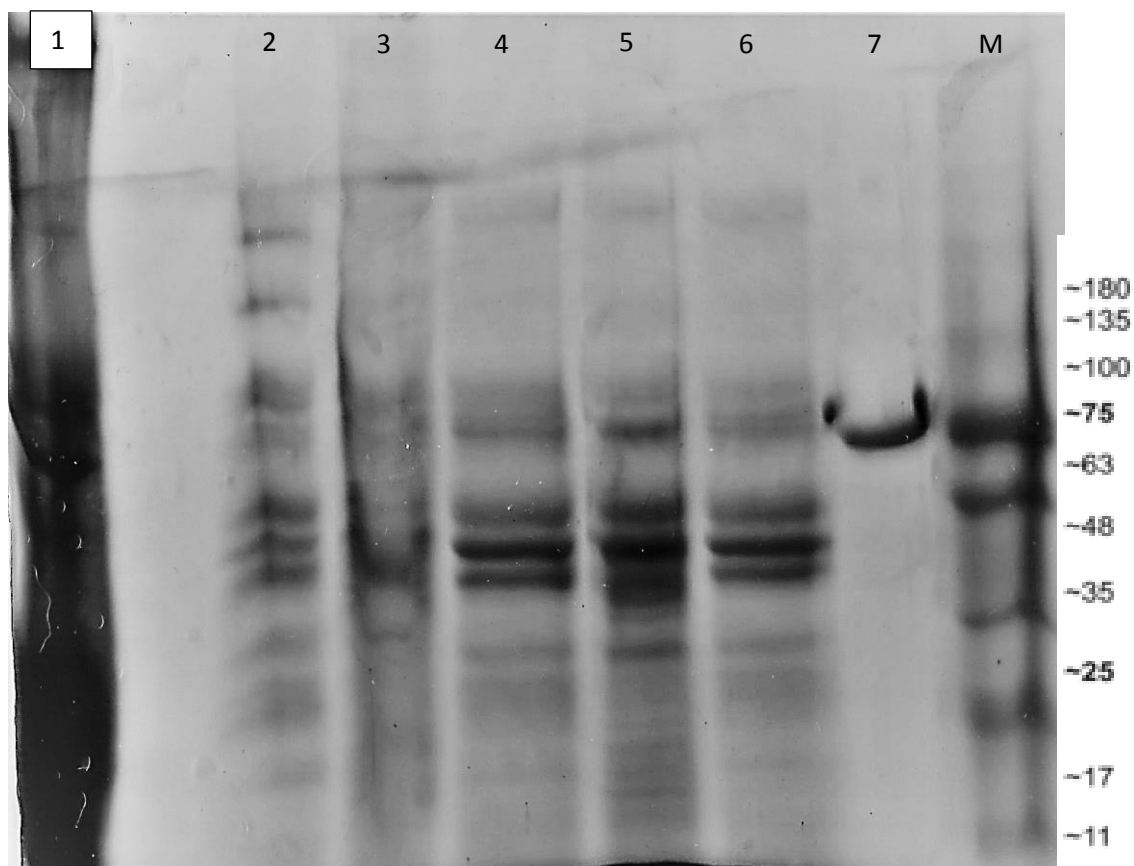
como Yugis et al., (2015) isolou de caprinos a lactoferrina de 82 KDa, Carvalho et al., (2014) isolou do soro de queijos a lactoferrina de 80 KDa.

Figura 21. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação pelo pl 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 ressuspendido à pH 5.2 (90 µg), (5): 2ª sobrenadante à pH5.2 (90 µg), (6): 2ª precipitado ressuspendido à pH 5.2 (90 µg), (7): 1ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (8): 1ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 (90 µg), (9): 2ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg) e (10): 2ª precipitado ressuspendido à pH 8.3 (90 µg).



Fonte: Autor, 2021.

Figura 22. Perfil eletroforético SDS- PAGE da lactoferrina bubalinas da purificação isoeétrica pelo pl 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 ressuspensionado à pH 8.3 (90 µg), (4): 1ª sobrenadante à pH 8.3 (90 µg), (5): 2ª precipitado ressuspensionado 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, 2021.

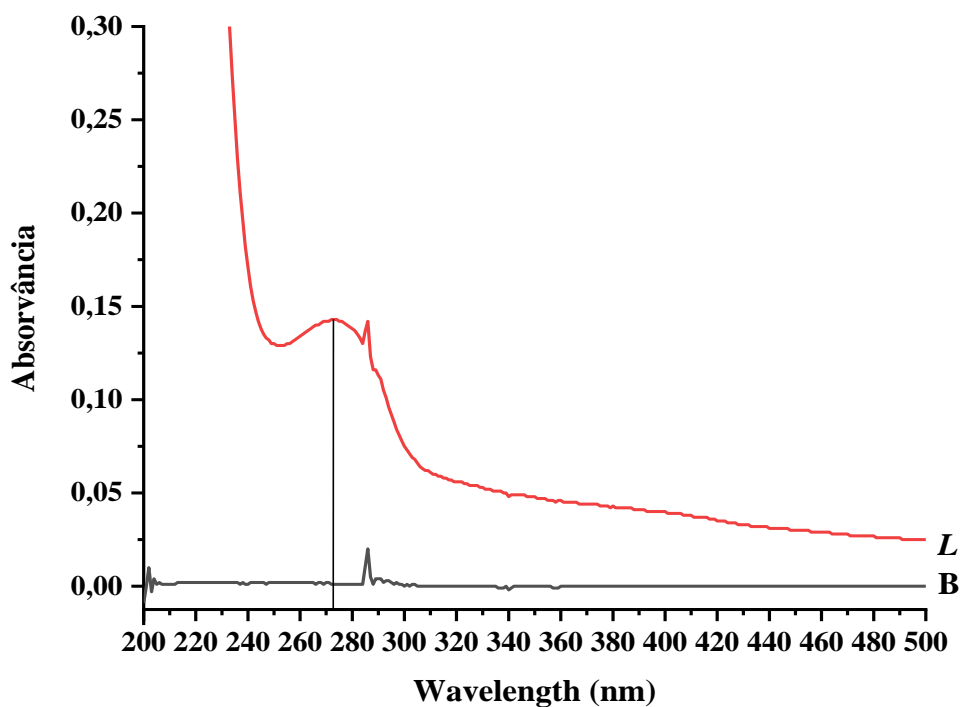
Quando comparada a purificação isoeétrica pelo pl da lactoferrina e a purificação por cromatografia de gel filtração é possível afirmar que a purificação por gel filtração obteve melhor eficiência, mas a purificação isoeétrica pelo pl da lactoferrina torna-se um método de purificação viável, rápido e barato para a lactoferrina bubalina.

5.6 Espectroscopia UV-vis: absorção espectral UV-vis da lactoferrina com o antibiótico amoxicilina.

A lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada apresentou um pico de absorção máximo em 272,76 nm (**Figura 23**) devido às ligações duplas do conjugado em resíduos de tirosina e triptofano, o que era típico para proteínas contendo aminoácidos aromáticos. Resultado parecido obtido por Huang et al. (2018), em estudos com lactoferrina bovina obteve um pico máximo de absorção de 280 nm. Morin, (2013) em estudos espectrais de UV-vis de absorção com lactoferrina bovina em que verificou que tem o pico típico em 280 nm e nenhum pico de absorção adicional em 632 nm, o que significa que os íons de ferro na proteína não interferem nas medições de dispersão de luz.

É possível observar a presença de pequeno pico em todas as análises de UV-vis. Este pico não advém de impurezas do tampão, mas é um sinal elétrico do equipamento.

Figura 23. Espectro de absorção de UV-vis de lactoferrina de bubalinos (2,8 μM) parcialmente purificada por purificação isoelétrica .

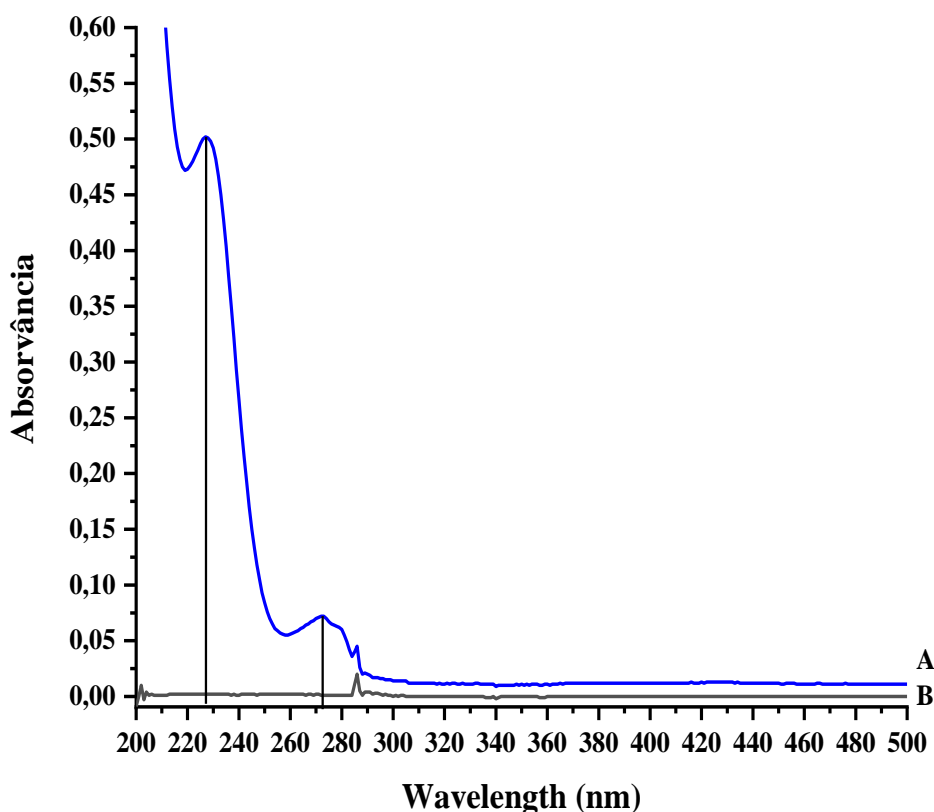


Os espectros de absorção de UV são comumente usados para fornecer informações sobre as mudanças na estrutura da proteína devido à interação com outro composto (WANG et al., 2019). Diante disso, os fármacos amoxicilina e quercetina foram escolhidos devido a sua utilização na indústria de alimentos e agropecuária.

A amoxicilina é utilizada em infecções no úbere, mesmo que sub-clínicas, influenciam grandemente a composição do leite, como a mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A maioria das infecções tem origem bacteriana, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Em função dessas infecções, os antibióticos têm sido bastante utilizados nas fazendas e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando a cura de mamites, ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético (SANTOS, 2015).

O antibiótico amoxicilina apresentou um espectro de absorção de UV-vis com dois picos; o primeiro pico forte centrado de absorção máximo em 227,22 nm e o segundo pico centrado de absorção máximo em 272,57 nm (**Figura 24**). O pico de 227,22 nm é característico da estrutura do peptídeo, enquanto o pico de 272,57 nm é típico de proteínas contendo aminoácidos aromáticos.

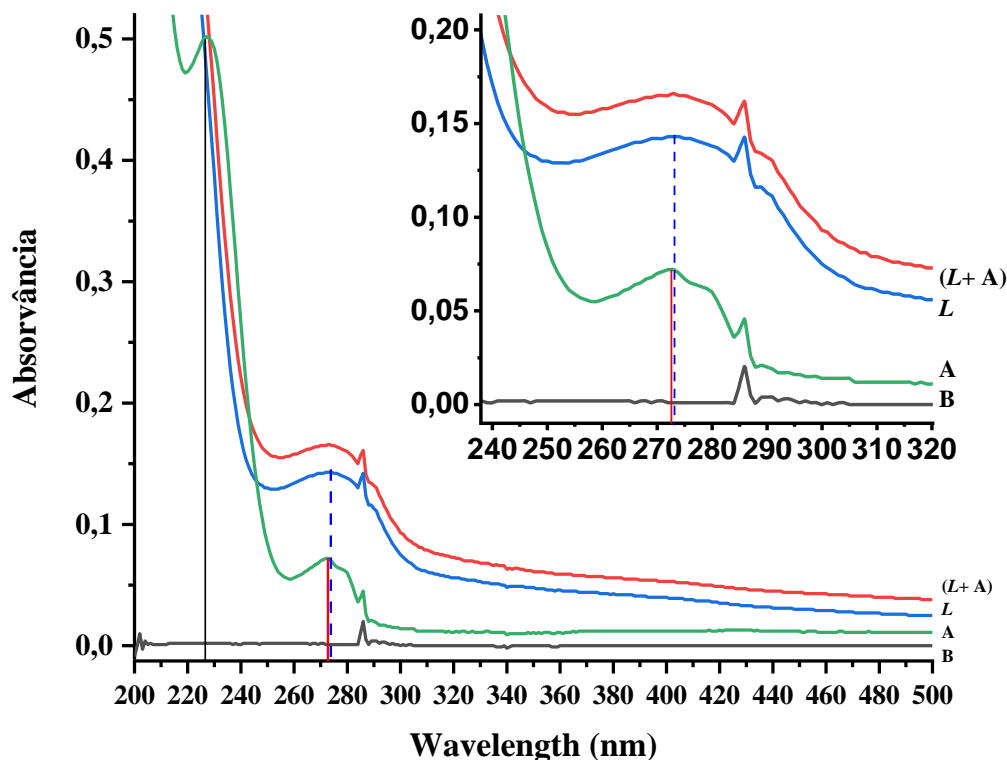
Quando a lactoferrina de bubalino parcialmente purificada foi testada na presença de amoxicilina com a concentração de 3×10^{-6} mol.L⁻¹, observou-se o pico efeito hipercrômico, o aumento da absorbância do pico do espectro UV-vis de absorção máxima em 273,11 nm da lactoferrina na presença de amoxicilina (3×10^{-6} mol.L⁻⁶) em comparação com o espectro UV-vis de absorção máxima da lactoferrina parcialmente purificada (**Figura 25**). Além disso, quando comparados os espectros de UV-vis de absorção máxima de amoxicilina e o espectros UV-vis de absorção máxima de lactoferrina em presença de amoxicilina (3×10^{-6} mol.L⁻¹) observar-se o desaparecimento do primeiro pico de UV-vis de absorção máxima da amoxicilina quando é adicionada na presença de lactoferrina (**Figura 25**). O microambiente próximo ao resíduo de aminoácido é determinado pela conformação da molécula de proteína que pode acarretar em mudanças estruturais da proteína.

Figura 24. Espectro UV-vis da amoxicilina 2,5 Mm.

Fonte: Autor, 2021.

Quando a lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada foi colocada na presença de amoxicilina de concentração de 1 a 8×10^{-6} mol.L⁻¹ (**Figura 26**), observou-se que a absorvância aumentou com um aumento de concentração na região de 272,65 nm. Além disso, na **Figura 26** é possível observar que a complexação da amoxicilina com a lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada gerou um leve desvio para redshift, mudando o pico de absorvância máxima de 271,52 nm para 272,65 nm. Desse modo, gerou um aumento no comprimento de onda (efeito batocrômico). Os resultados sugeriu que a amoxicilina alterou significativamente a polaridade em torno do aumento de 1 para 8 μ M.

Figura 25. Espectro de absorção de UV-vis de (L) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada por purificação isoelétrica (2,8 μ M), (A) amoxicilina (2,5 mM) e (L + A) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de amoxicilina (3×10^{-6} mol.L⁻¹).



Fonte: Autor, 2021.

Um estudo semelhante realizado por Sun et al. (2018), em que estudou a interação entre a lactoferrina bovina (bLf) e o Cloridrato de Tetraciclina (TCH) através dos espectros de absorção de UV-vis. Os espectros UV-vis mostraram claramente que um novo pico de absorção apareceu em 360 nm, o que sugeriu que a adição de TCH levou à mudança de conformação de bLf. segundo o mesmo estudo, as posições máximas dos picos dos complexos tiveram leves deslocamentos para o vermelho, o que mostrou que a hidrofobicidade do microambiente dos resíduos de aminoácidos aromáticos diminuiu.

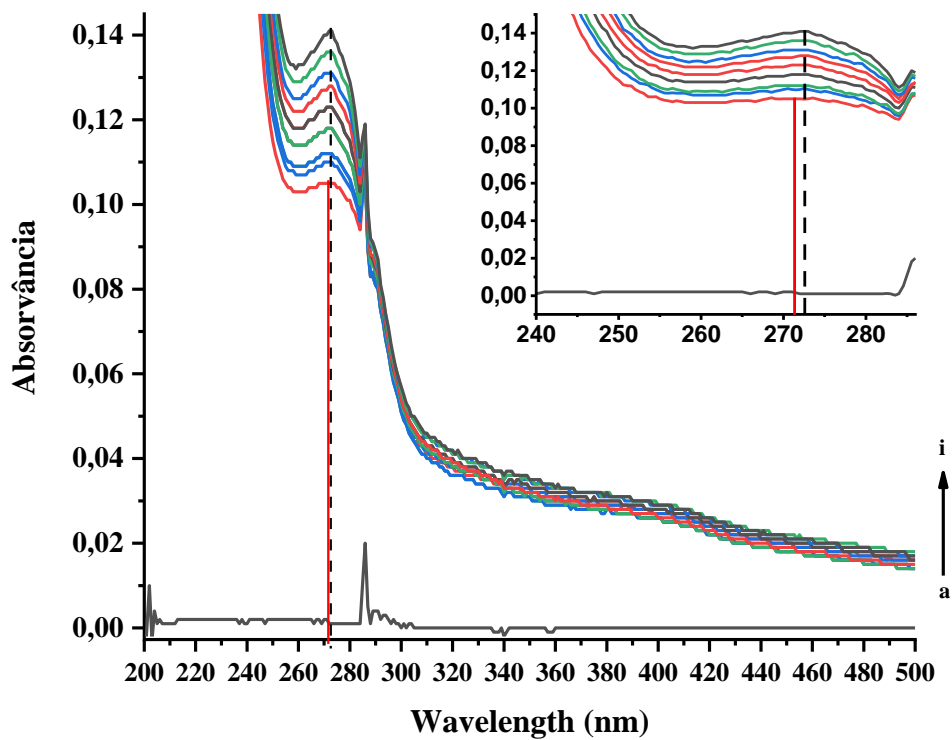
Além disso, os espectros de UV-vis exibiram mudanças distintas palpáveis entre os espectros de absorção de bLf após a adição de TCH. De modo que a influência do TCH nas alterações funcionais da proteína foi estudada através da análise da alteração da hidrofobicidade da superfície bLf e pesquisa das forças de ligação entre o bLf e o íon ferro. Esses resultados indicaram que

a mudança na estrutura e função de bLf foi devido à interação entre bLf e TCH (SUN et al., 2018).

A interação do lactoferrina com o fármaco amoxicilina mostram mudanças em espectrais observadas no espectro de absorção de UV-vis que indicam a presença de amoxicilina tornou a força de ligação maior e o número de locais de ligação também aumentou. Portanto, podemos deduzir que o amoxicilina alterou a estrutura original de Lf de bubalino parcialmente purificada e tornou sua estrutura menos compactada. Isso levou à exposição dos locais de ligação do ferro, portanto, as forças de ligação entre Lf de bubalinos parcialmente purificada e Fe^{3+} foram aumentadas. Além disso, o efeito na função da proteína devido às várias prot propriedades de bLf intimamente relacionadas à sua capacidade de ligação ao ferro.

A respeito das mudanças na hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade das proteínas, irá alterar diretamente a função biológica da proteína. Especular: a precipitação da proteína ocorrerá quando a hidrofobicidade da superfície da proteína aumentar. Em contraste, as estruturas das proteínas tornam-se menos compacta e têm maior probabilidade de serem expostas à solução quando a hidrofobicidade da superfície da proteína diminui (FAN et al., 2006; ZHANG et al., 2018).

Figura 26. Espectros UV-visíveis de lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de amoxicilina nas concentrações $(0,1,2,3, 4,5,6,7,8) \times 10^{-6}$ mol/L.



Fonte: Autor, 2021.

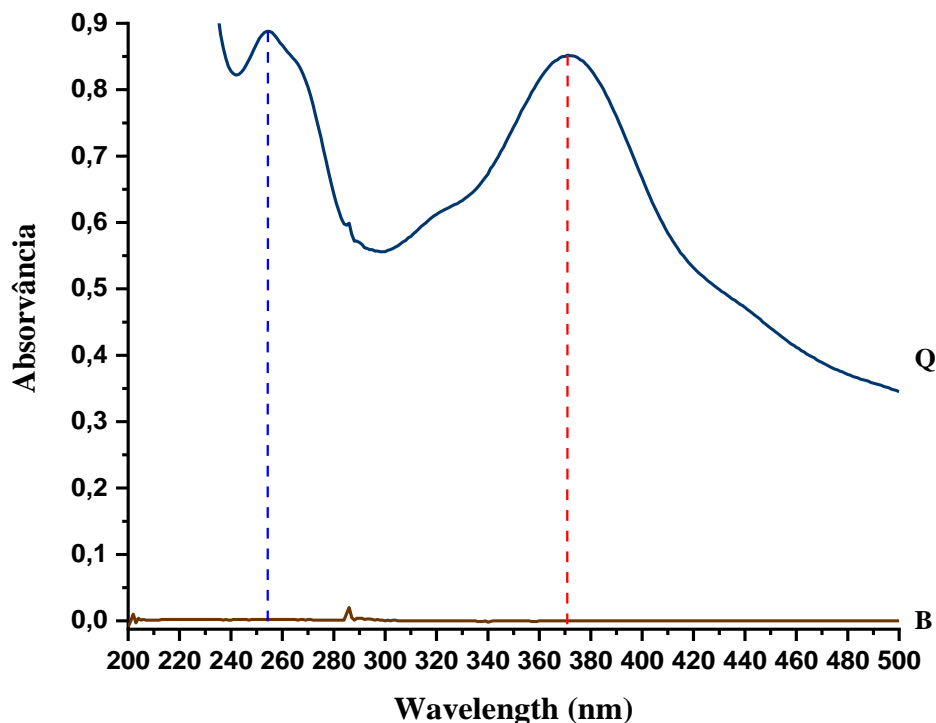
5.7 Espectroscopia UV-vis: absorção espectral UV-vis da lactoferrina com o flavonoide quercetina (QCT).

A quercetina trata-se de um flavonoide que atua como antioxidante não enzimático capaz de inibir a formação de radicais livres pela interação com íons superóxidos, através da reação com radicais peroxilipídicos e por quelação de íons ferro (SILVA et al., 2018). Pode ser encontrada em frutas, sementes, grãos, folhas (couve, cebola vermelha, caules e raízes). Também é utilizada como ingrediente em suplementos alimentares e bebidas funcionais (MACHADO et al., 2008).

Os espectros de absorção de UV-vis foram medidos para explorar a mudança estrutural de Lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada com a adição de quercetina (QCT). Na **Figura 27** a quercetina apresentou no espectro de absorção de UV-vis dois picos, o primeiro pico forte centrado em cerca de

254,43 nm e o segundo pico centrado em 370,98 nm. O pico em 254,43 nm está próximo de 257 nm é típico do aminoácido aromático fenilalanina (Phe), enquanto o pico 370,98 nm é o pico característico dos flavonoides.

Figura 27. Espectro UV-vis da quercetina 2,5 Mm.



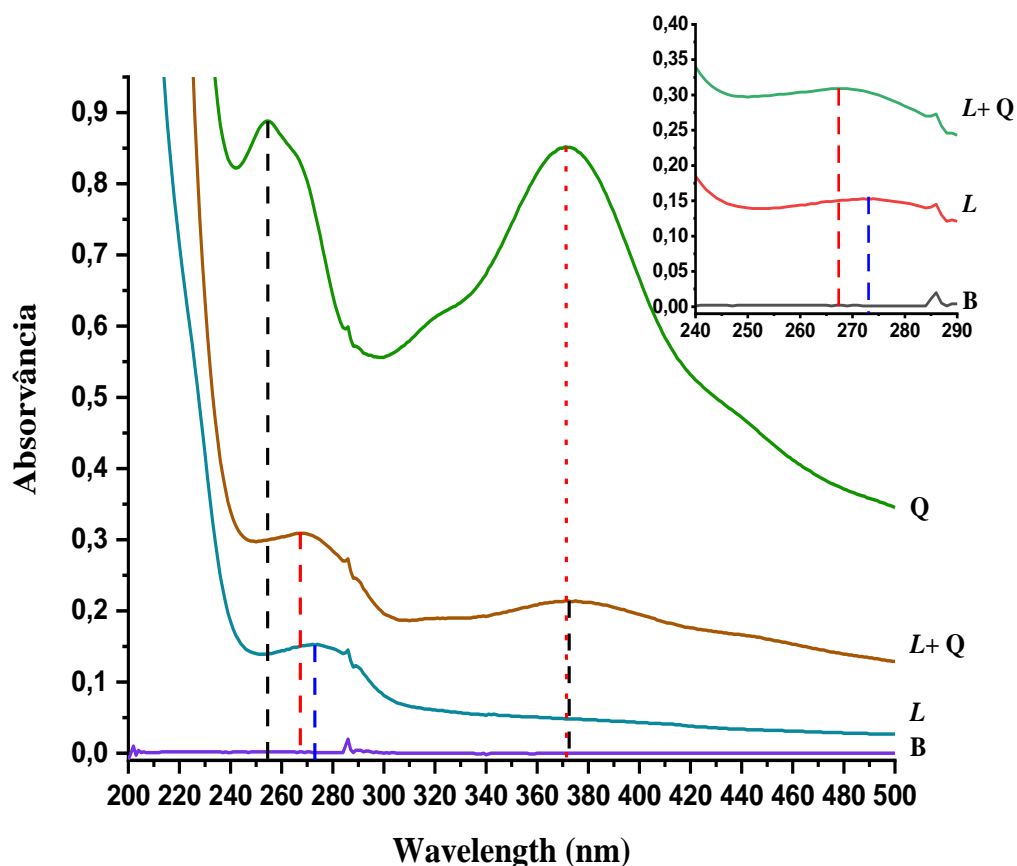
Fonte: Autor, 2021.

Quando avaliada a interação da lactoferrina de bubalino parcialmente purificada na presença de QCT com a concentração de 3×10^{-6} mol.L⁻¹, é possível observar que a absorvância aumentou quando a QCT foi adicionada na presença Lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada, efeito hipercrômico (**Figura 28**). Além disso, ao adicionar a QCT 3×10^{-6} mol.L⁻¹ ocorreu o leve desvio para o azul (blueshift) mudando o pico de absorvância máxima de 273,37 nm para 261,28 nm. Desse modo, o gerando uma diminuição do comprimento de onda (efeito hipercrômico) comparado com o espectro UV-vis de lactoferrina bubalina parcialmente purificada (**figura 28**).

O surgimento de um pico centrado em 370,98 nm no espectro de absorção de UV-vis de lactoferrina em presença de QCT (3×10^{-6} mol.L⁻¹) em relação os

espectro UV-vis de absorção de Lactoferrina. Esse surgimento é devido a formação de complexo quando adicionamos a QCT, ocorrendo o aumento da absorvância (efeito hiperacrômico). Além disso, quando comparado espectro de absorção máxima UV-vis da lactoferrina em presença de QCT (3×10^{-6} mol.L⁻¹) com o espectro de quercetina é possível observar o leve desvio para o vermelho (redshift) de 370,98 nm para 3071,28 nm, assim gerando um aumento no comprimento de onda (efeito batocrômico) (**Figura 28**).

Figura 28. Espectro de absorção de UV-vis de (L) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada por purificação isoelétrica (2,8 μ M), (Q) quercetina (2,5 mM) e (L + Q) lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de quercetina (3×10^{-6} mol.L⁻¹).



Fonte: Autor, 2021.

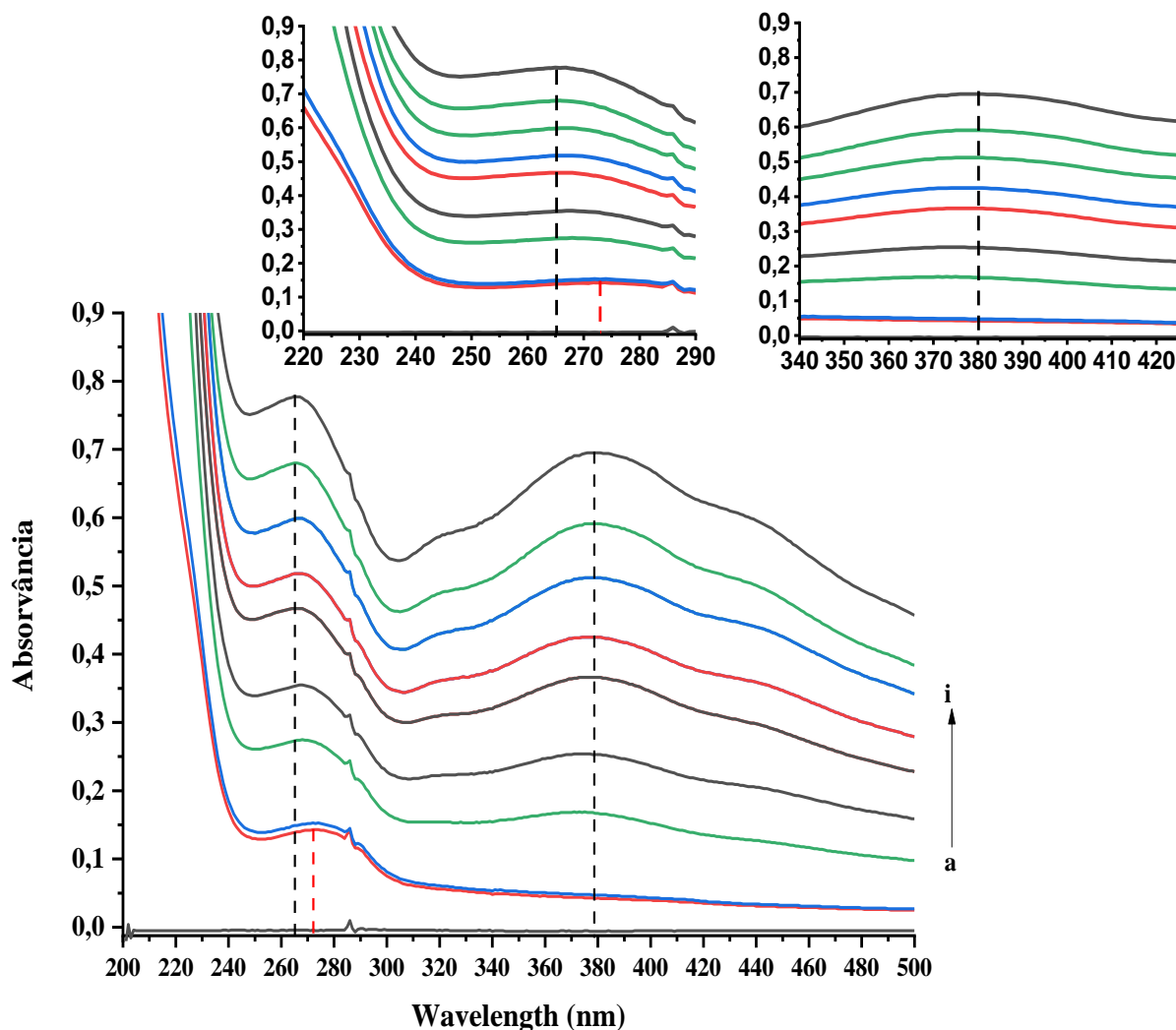
Quando a lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada foi colocada na presença de amoxicilina de concentração de 1 a 8×10^{-6} mol.L⁻¹. Observou-se que a complexação da quercetina com a lactoferrina de bubalinos parcialmente

purificada aumentou a absorvância com um aumento na concentração de lactoferrina no primeiro pico e o centro do pico de 268,68 nm mudou ligeiramente 265 nm para um comprimento de onda mais curto (blueshift). Simultaneamente, os valores de pico aumentaram gradualmente, sugerindo que as interações entre o flavonoide quercetina e lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada ocorreram, principalmente induzidas por ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica. Além disso, a adição do flavonoide quercetina resultou na presença de um novo pico em 378 nm, que é o pico característico dos flavonoides, e os valores de absorção do flavonoide aumentaram com o aumento da concentração de quercetina, o que confirmou ainda mais a ocorrência de interações entre a quercetina e lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada. Também indicam que a extensão de essas mudanças na estrutura terciária devido à complexação por fármacos são diferentes para cada proteína de soro de leite.

Um estudo com realizado com três flavonoides que investigou a interação entre os flavonoides 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 flavonoides e BLF ocorreram, principalmente induzidas por ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica. Além disso, a adição dos flavonoides resultou na presença de um novo pico em 370 nm, que é o pico característico dos flavonoides, e os valores de absorção dos flavonoides aumentaram com o aumento da concentração de flavonoides, o que confirmou ainda mais a ocorrência de interações entre três flavonoides e BLF (HUANG et al., 2018).

O flavonoide QCT se liga ao LF em Leu-320 e Tyr-324 com uma ligação de hidrogênio, respectivamente. Portanto, sugere-se que as ligações de hidrogênio são as que mais contribuem para a interação de QCT com LF. Obviamente, é possível que outras forças possíveis, como as interações hidrofóbicas, sejam essenciais para a ligação entre NGN e LF. O núcleo do flavonoide é o principal grupo hidrofóbico, que interage com o LF por meio de uma força hidrofóbica (HUANG et al., 2018).

Figura 29. Espectros UV-visíveis de lactoferrina de bubalinos parcialmente purificada na presença de quercetina (QCT) nas concentrações (0,1,2,3, 4,5,6,7,8) $\times 10^{-6}$ mol/L.



Fonte: Autor, 2021.

O estudo que investigou a interação de Bixina com as proteínas do soro do leite bovino, observou em seus espectros de absorção UV-vis que a absorbância aumentou com um aumento na concentração de bixina, e o centro do pico de 279 nm mudou ligeiramente para um comprimento de onda mais curto (blueshift), enquanto o pico de 230 nm mudou para um comprimento de onda mais longo (redshift). Ainda segundo o mesmo estudo, quando a ligação entre a bixina e as proteínas individuais do soro de leite foi estudada, o blueshift foi

observado de 277 a 272 nm para α -Lg, de 281 a 274 nm para α -Lac e de 278 a 276 nm para BSA (ZHANG; ZHONG, 2012).

A principal causa da absorção UV-visível é a absorção de luz pelos grupos da cadeia lateral de aminoácidos (Trp, Tyr e Phe). Além disso, as ligações peptídicas também têm uma forte absorção de luz. O pico a 280 nm no espectro de absorção ultravioleta-visível é o pico de absorção da ligação dupla dos resíduos Tyr e Trp. O pico que aparece perto de 257 nm é o pico de absorção de Phe, e o pico de absorção da estrutura da cadeia principal do polipeptídeo aparece em 210 nm. Em geral, o microambiente próximo ao resíduo de aminoácido é determinado pela conformação da molécula de proteína. Se a conformação da proteína mudar, o microambiente e o espectro de absorção ultravioleta-visível perto do resíduo de aminoácido mudarão. O inverso também é verdadeiro, se houver diferença no espectro de absorção das proteínas após a adição de pequenas moléculas, pode-se dizer que a conformação da proteína mudou (SUN et al., 2018).

Portanto, os resultados sugerem que a adição de fármacos altera a polaridade em torno da proteína: alguns resíduos como Trp e Tyr ficam expostos a um ambiente mais polar, enquanto alguns resíduos externos ficam embutidos em proteínas globulares.

6 CONCLUSÃO

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

A purificação da lactoferrina bubalina por cromatografia líquida de gel filtração Sephacryl S-100 apresentando três picos de estimativa de proteínas no perfil de absorbância a 280 nm. Sendo necessário a repetição da purificação para obter uma maior pureza na cromatografia em gel filtração Sephacryl S-100 com alguns ajustes na etapa de pré-purificação, diminuição do volume da amostra, fracionamento maior do volume da amostra coletada, modificação no fluxo de eluição, aumento da coluna cromatográfica.

A caracterização da lactoferrina bubalina purificada mostrou que o gel de poli(acrilamida) 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). Sendo este gel de poli(acrilamida) utilizado nas próximas purificações de lactoferrina bubalina.

Os estudos espectrofotométricos da lactoferrina bubalina purificada acoplada com a amoxicilina e quercetina permitiram estudar a interação da proteína-antibiótico e proteína-flavonoide. Os estudos dos espectros UV-visível de absorção mostraram que a amoxicilina e 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. Gerando alterações na polaridade em torno da proteína: alguns resíduos como Phe, Trp e Tyr ficam expostos a um ambiente mais polar, enquanto alguns resíduos externos ficam embutidos em proteínas globulares.

A purificação isoelétrica mostrou eficiência e rapidez onde foi possível isolar parcialmente a lactoferrina de bubalinos de forma rápida e simples em comparação com a purificação por cromatografia.

O gel SDS-PADE 10% em condições redutoras da lactoferrina de bubalinos purificada parcialmente através da purificação isoelétrica apresentou uma banda no 2ª perfil do precipitado ressuspendido pH 8.3 com o peso molecular superior a 75 KDa e semelhante a lactoferrina bovina (SIGMA, USA). Obtendo uma purificação parcial da lactoferrina de bubalinos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. A. ANGELES, F. E. MERCA; N. P. ROXAS. **Philippine EJournals_ ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTOFERRIN FROM CARABAO'S (Bubalus bubalis L.) MILK WHEY (1).pdf**, [s.d.].

ABBAS, Z. H.; DOOSH, K. S.; YASEEN, N. Y. Isolation, purification and characterization of lactoferrin from goat colostrum whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 14, n. 8, p. 517–523, 2015.

ACOSTA-ZALDÍVAR, M. et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis**, v. 21, n. 2, p. 163–173, 2016.

AHMAD, S. et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. **JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, n. 1 Supplement, p. 62–74, 2013a.

AHMAD, S. et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. **JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, n. 1 Supplement, p. 62–74, 2013b.

ALMEIDA, C. C. DE et al. 1* , 2 , 2 , 3. p. 1840–1854, 2013.

ALVES DE SANTANA, D. Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEIN DURANTE O TREINAMENTO DE FORÇA NA MASSA MAGRA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. p. 68–79, 2014.

Aminoácidos e proteínas pgs 9 a 13 e 17. [s.d.].

AMIRI, F.; MORADIAN, F.; RAFIEI, A. Anticancer effect of lactoferrin on Gastric Cancer Cell Line AGS. **Research in Molecular Medicine**, v. 3, n. 2, p. 11–16, 2015.

AMMENDOLIA, M. G. et al. Bovine lactoferrin inhibits echovirus endocytic pathway by interacting with viral structural polypeptides. **Antiviral Research**, v. 73, n. 3, p. 151–160, 2007.

ANDERSEN, J. H. et al. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of

human cytomegalovirus into human fibroblasts. **Antiviral Research**, v. 51, n. 2, p. 141–149, 2001.

ANDRÉS, M. T.; ACOSTA-ZALDÍVAR, M.; FIERRO, J. F. Antifungal mechanism of action of lactoferrin: Identification of H⁺-ATPase (P3A-type) as a new apoptotic-cell membrane receptor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4206–4216, 2016.

ANDRÉS, M. T.; VIEJO-DÍAZ, M.; FIERRO, J. F. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: Critical role of K⁺-channel-mediated K⁺ efflux. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4081–4088, 2008.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 2531–2539, 2005.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 3–10, 2009.

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.

BAKER, H. M.; BAKER, E. N. A structural perspective on lactoferrin function. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 320–328, 2012.

BASSAN, J. C. Universidade estadual paulista. 2012.

BEHR, M. A.; SCHWARTZMAN, K.; PAI, M. Tuberculosis vaccine trials. **The Lancet**, v. 381, n. 9885, p. 2252–2253, 2013.

BELJAARS, L. et al. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 63, n. 3, p. 197–208, 2004.

BELTING, M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 145–151, 2003.

BERLUTTI, F. et al. Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6992–7012, 2011.

BRANEN, J.; DAVIDSON, P. M. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: The effect of EDTA. **Letters in**

Applied Microbiology, v. 30, n. 3, p. 233–237, 2000.

BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 194–202, 2001.

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

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

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

CAPITANI, C. D. et al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123–1128, 2005.

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.

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

CARUSO, P. Ícaro Putinhon Caruso Estudo da Interação entre Flavonóides e a Albumina do Soro Humano São José do Rio Preto - SP Ícaro Putinhon Caruso Estudo da Interação entre Flavonóides e a Albumina do Soro Humano São José do Rio Preto - SP. 2012.

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

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

CHMELÍK, J.; MAZANEC, K.; ŠLAIS, K. Novel staining-free proteomic method

for simultaneous identification of proteins and determination of their pI values by using low-molecular-mass pI markers. **Electrophoresis**, v. 28, n. 18, p. 3315–3323, 2007.

CONNELLY, O. M. Antiinflammatory Activities of Lactoferrin. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. November 2014, p. 389S-395S, 2001.

CUI, J. et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3270–3285, 2014.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. v. 26, p. 343–356, 2005.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. International Journal of Antimicrobial Agents Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. v. 38, p. 99–107, 2011.

CUTONE, A. et al. Lactoferrin prevents LPS-induced decrease of the iron exporter ferroportin in human monocytes/macrophages. **BioMetals**, v. 27, n. 5, p. 807–813, 2014.

CUTONE, A. et al. Lactoferrin efficiently counteracts the inflammation-induced changes of the iron homeostasis system in macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, 2017.

CUTONE, A. et al. Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 1–26, 2020.

DAVOODI, S. H. et al. Health-related aspects of milk proteins. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 3, p. 573–591, 2016.

DE CARVALHO, C. A. M. et al. In vitro inhibition of SARS-CoV-2 infection by bovine lactoferrin. **bioRxiv**, p. 3–6, 2020.

DE JONGE, M. I. et al. Tuberculosis: From genome to vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 541–551, 2005.

DIJKSHOORN, L. et al. The synthetic n-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4919–4921, 2004.

DOURSOUT, M. F. et al. Lactoferrin moderates LPS-induced hypotensive response and gut injury in rats. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 227–231, 2013.

DRAGO-SERRANO, M. E. et al. Lactoferrin: Balancing ups and downs of inflammation due to microbial infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

DRAGO SERRANO, M. E. Antibacterial activities of lactoferrin. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 26, n. 2, p. 58–63, 2006.

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

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

DZITKO, K. et al. Toxoplasma gondii: Inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 25–32, 2007.

EL-FAKHARANY, E. M. Nanoformulation of lactoferrin potentiates its activity and enhances novel biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 970–984, 2020.

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.

FAN, J. CAI et al. Binding interactions of pefloxacin mesylate with bovine lactoferrin and human serum albumin. **Journal of Zhejiang University. Science. B.**, v. 7, n. 6, p. 452–458, 2006.

FANGMEIER, M. et al. Effects of cow , goat , and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. v. 2061, n. June, p. 122–128, 2019.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin - A multifunctional protein with

- antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395–405, 2003.
- FERNANDES, K. E.; CARTER, D. A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: Mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–10, 2017.
- FISCHBORN, S. A influência do tempo de ingestão da suplementação de Whey Protein em relação à atividade física. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 14, p. 7, 2009.
- FLETCHER, H.; MCSHANE, H. Tuberculosis vaccines: Current status and future prospects. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 11, n. 2, p. 207–215, 2006.
- FLORES-VILLASEÑOR, H. et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 569–578, 2010.
- GARCÍA-MONTOYA, I. A. et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226–236, 2012.
- GIANG, D. T.; HOANG, V. D. Comparative study of RP-HPLC and UV spectrophotometric techniques for the simultaneous determination of amoxicillin and cloxacillin in capsules. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 2, p. 190–195, 2010.
- GIANSANTI, F. et al. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2016.
- GIBBONS, J. A.; KANWAR, J. R.; KANWAR, R. K. Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2015.
- GÓMEZ, J. C. et al. REVISIÓN DE TEMA: Amebiasis intestinal. **Asociación Colombiana De Infectología**, v. 11, n. 1, p. 36–45, 2007.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009.
- GUEDES, J. P. et al. Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro. **Frontiers in**

Oncology, v. 8, n. JUN, p. 1–12, 2018.

GÜLFEN, M.; CANBAZ, Y.; ÖZDEMİR, A. Simultaneous Determination of Amoxicillin, Lansoprazole, and Levofloxacin in Pharmaceuticals by HPLC with UV–Vis Detector. **Journal of Analysis and Testing**, v. 4, n. 1, p. 45–53, 2020.

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

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.

HEGAZY, R. R. et al. Regulation of PKB/Akt-pathway in the chemopreventive effect of lactoferrin against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 5, p. 879–891, 2019.

HENDRIXSON, D. R. et al. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 607–617, 2003.

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

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

HUTCHENS, T. W.; HENRY, J. F.; YIP, T. T. Structurally intact (78-kDa) forms of maternal lactoferrin purified from urine of preterm infants fed human milk: Identification of a trypsin-like proteolytic cleavage event in vivo that does not result in fragment dissociation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 8, p. 2994–2998, 1991.

HWANG, S. A.; KRUZEL, M. L.; ACTOR, J. K. CHO expressed recombinant human lactoferrin as an adjuvant for BCG. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 452–468, 2015.

HYDE, A. M. et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by

the Hofmeister Series. **Organic Process Research and Development**, v. 21, n. 9, p. 1355–1370, 2017.

IIGO, M. et al. Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine. **BioMetals**, v. 27, n. 5, p. 1017–1029, 2014.

IKADAI, H. et al. Short report: Inhibitory effect of lactoferrin on in vitro growth of *Babesia caballi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 710–712, 2005.

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

JONES, R. M.; NEISH, A. S. Recognition of bacterial pathogens and mucosal immunity. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 670–676, 2011.

KANE, S. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1309–1314, 2003.

KANWAR, J. et al. Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite–host interaction. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 3821, 27 jul. 2015.

KARAV, S. et al. Studying lactoferrin N-glycosylation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–14, 2017.

KARIN, M.; LAWRENCE, T.; NIZET, V. Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 823–835, 2006.

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.

KHARE, A. et al. Myocardial Infarction & mdash; Diagnostic Prognostic Significance. v. 48, n. 4, p. 504–510, 2004.

KHEDKAR, C. D.; KALYANKAR, S. D.; DEOSARKAR, S. S. **Buffalo milk**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016.

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

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

KOZU, T. et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 11, p. 975–983, 2009.

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

KÜHNLE, A. et al. Polysialic acid interacts with lactoferrin and supports its activity to inhibit the release of neutrophil extracellular traps. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, n. August 2018, p. 32–41, 2019.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 5–7, 2003.

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

LANG, J. et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

LEE, S. U. et al. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 5–6, p. 290–296, 2008.

LEFFELL, M. S.; SPITZNAGEL, J. K. Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 5, p. 761–765, 1972.

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

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

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

LEON-SICAIROS, N. et al. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p.

133–140, 2009.

LEÓN-SICAIROS, N. et al. Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 3, p. 327–336, 2006.

LI, S. et al. Inhibition of HBV infection by bovine lactoferrin and iron-, zinc-saturated lactoferrin. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 1, p. 19–25, 2009a.

LI, Y. et al. Study on the interaction between 3 flavonoid compounds and α -amylase by fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, 2009b.

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

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

LÓPEZ-SOTO, F. et al. Microbicidal effect of the lactoferrin peptides Lactoferricin17-30, Lactoferrampin265-284, and Lactoferrin chimera on the parasite *Entamoeba histolytica*. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 563–568, 2010.

LOZANO A, M. C.; ARIAS M, D. C. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 21, n. 1, p. 121–135, 2008.

LUZI, C. et al. Apoptotic effects of bovine apo-lactoferrin on HeLa tumor cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 35, n. 1, p. 33–41, 2017.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico: [revisão]. **Bol. Centro Biol. Reprod**, p. 39–33, 2008.

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

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

- MENDES, C. G. et al. Pesquisa De Resíduos De Beta-Lactâmicos No Leite Cru Comercializado Clandestinamente No Município De Mossoró, Rn, Utilizando O Delvotest Sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 95–98, 2008.
- MINJ, S.; ANAND, S. Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. **Dairy**, v. 1, n. 3, p. 233–258, 2020.
- MOOSMANN, A. et al. Aldehyde PEGylation kinetics: A standard protein versus a pharmaceutically relevant single chain variable fragment. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1545–1558, 2011.
- MORADIAN, F.; SHARBAFI, R.; RAFIEI, A. Lactoferrin, Isolation, Purification and Antimicrobial Effects. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 203–206, 2014.
- MORENO-EXPÓSITO, L. et al. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. **Life Sciences**, v. 195, n. November 2017, p. 61–64, 2018.
- MORIN, M. Probing the Intermolecular Interactions of Lactoferrin. n. June, 2013.
- MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: Um estudo de base populacional. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515–3522, 2013.
- MURATA, M. et al. Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 4891–4898, 2013.
- NIBBERING, P. H. et al. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1469–1476, 2001.
- NOJIMA, Y. et al. Development of poly(ethylene glycol) conjugated lactoferrin for oral administration. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2253–2259, 2008.
- OCHOA, T. J.; CLEARY, T. G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 30–34, jan. 2009.
- OLIVEIRA, D. F. DE; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do instituto de laticínios Cândido Torres**, v. 67, n. 385, p. 64–71, 2012.
- OMIDVAR, Z.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. Studies on the antagonistic behavior

between cyclophosphamide hydrochloride and aspirin with human serum albumin: Time-resolved fluorescence spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Journal of Solution Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1005–1017, 2013.

PEREIRA, C. S. et al. Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H⁺-ATPase. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 62144–62158, 2016.

PIETRANTONI, A. et al. Bovine Lactoferrin Inhibits Adenovirus Infection by Interacting with Viral Structural Polypeptides Bovine Lactoferrin Inhibits Adenovirus Infection by Interacting with Viral Structural Polypeptides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2688–2691, 2003.

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

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

QIU, J. et al. Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 21, p. 12641–12646, 1998.

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

RAMOS-CLAMONT, G. et al. Actividad antibacteriana de lactoferrina bovina y lactoferrina porcina sobre *Escherichia coli* K88+. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, v. 20, n. 5, p. 473–479, 2010.

RBENJAMIN, S. 基因的改变 **NIH Public Access**. [s.l: s.n.]. v. 23

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.

REDWAN, E. M. et al. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 337, n. 10, p. 581–595, 2014.

RIEDL, S. et al. Human lactoferricin derived di-peptides deploying loop structures induce apoptosis specifically in cancer cells through targeting membranous phosphatidylserine. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 11, p. 2918–2931, 2015.

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

RODRIGUES, L. et al. Lactoferrin and cancer disease prevention. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 203–217, 2009.

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

ROSA, L. et al. Lactoferrin: A natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

ROSEANU, A. et al. Antibacterial activity of lactoferrin and lactoferricin against oral streptococci. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 6, p. 5788–5792, 2010.

SANTOS, C.; NASCIMENTO, F. Consumo isolado de aminoácidos de cadeia ramificada e síntese de proteína muscular em humanos: uma revisão bioquímica. **Einstein**, v. 17, n. 2, p. 1–16, 2019.

SANTOS, S. M. L. G. Comercializadas No Município De Cáceres-Mt. 2015.

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

SESSA, R. et al. Effect of bovine lactoferrin on *Chlamydia trachomatis* infection and inflammation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 34–40, 2017.

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

SHAHRIAR, F.; GORDON, J. R.; SIMKO, E. Identification of lipopolysaccharide-binding proteins in porcine milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 4, p. 243–250, 2006.

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.

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

SHERMAN, M. P. et al. Neonatal small bowel epithelia: Enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 285–289, 2004.

SILVA, E. F.; MELO M. B.; GOMES, M. M. O. S.; MACHADO, S. S.; GALDINO, F. C. A. LACTOFERRINA: PROPRIEDADES ESTRUTURAIAS E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS. p. 183–194, 2021.

SILVA, L. F. M. C. et al. Quercetin Promotes Increase in the Fertility Rate of Frozen Semen of Stallions Considered Sensitive to Freezing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, n. February 2019, p. 82, 2018.

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

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

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

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

SUGIHARA, Y. et al. Inhibition of DMH-DSS-induced colorectal cancer by liposomal bovine lactoferrin in rats. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5688–5694, 2017.

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

SUN, X. et al. "Iron-saturated" bovine lactoferrin improves the chemotherapeutic effects of tamoxifen in the treatment of basal-like breast cancer in mice. **BMC Cancer**, v. 12, p. 1–12, 2012.

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

TANAKA, T. et al. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 6, p. 619–625, 2004.

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

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

TOMITA, M. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 109–112, 2002.

TUNG, Y. T. et al. Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2095–2106, 2013.

VALENTI, P. et al. Lactoferrin decreases inflammatory response by cystic fibrosis bronchial cells invaded with *Burkholderia cenocepacia* iron-modulated biofilm. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 1057–1068, 2011.

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

3, p. 284–292, 2012.

VAN DER KRAAN, M. I. A. et al. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, v. 25, n. 2, p. 177–183, 2004.

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

VENKATESH, M. P.; RONG, L. Human recombinant lactoferrin acts synergistically with antimicrobials commonly used in neonatal practice against coagulase-negative staphylococci and *Candida albicans* causing neonatal sepsis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1113–1121, 2008.

VIEIRA, T. S. W. J. et al. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791–796, 2012.

VIJAYAN, S. et al. Isolation and purification of lactoferrin from colostrum of Malabari goats. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 5, n. 4, p. 550–555, 2017.

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.

VUIGNIER, K. et al. Drug-protein binding: A critical review of analytical tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 53–66, 2010.

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

WAKABAYASHI, H. et al. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 419–424, 2010.

WAKABAYASHI, H. et al. **Lactoferrin for prevention of common viral infections** *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2014.

WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TAKASE, M. Lactoferrin research, technology and applications. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1241–1251, 2006.

WANG, C. et al. Interactions between β -lactoglobulin and 3,30-diindolylmethane in model system. **Molecules**, v. 24, n. 11, 2019.

- WANG, J. et al. Inhibitory effect of lactoferrin against gray mould on tomato plants caused by *Botrytis cinerea* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 151–157, 2013.
- WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELY, O. M. Lactoferrin and host defense. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 95–102, 2002.
- WINGFIELD, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, p. A.3F.1-A.3F.8, 1998.
- WONG, J. H. et al. A study of effects of peptide fragments of bovine and human lactoferrins on activities of three key HIV-1 enzymes. **Peptides**, v. 62, p. 183–188, 2014.
- WU, M. BIN; XU, Y. J. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 2, p. 155–160, 2009.
- XU, G. et al. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1311–1318, 2010.
- YAMAUCHI, K. et al. Bovine lactoferrin: Benefits and mechanism of action against infections. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 3, p. 291–296, 2006.
- YANG, W. et al. Molecular interaction between (-)-epigallocatechin-3-gallate and bovine lactoferrin using multi-spectroscopic method and isothermal titration calorimetry. **Food Research International**, v. 64, p. 141–149, 2014.
- YEMETS, A. I. et al. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin. **Cell Biology International**, v. 38, n. 9, p. 989–1002, 2014.
- YUGIS, A. R. et al. Comparison of Methods for The Purification of Goat Lactoferrin and Antiviral Activity to Human Papillomavirus. v. 3, n. 5, p. 171–175, 2015.
- ZAREMBER, K. A. et al. Human Polymorphonuclear Leukocytes Inhibit *Aspergillus fumigatus* Conidial Growth by Lactoferrin-Mediated Iron Depletion. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6367–6373, 2007.
- ZHANG, J.; DAI, X. F.; HUANG, J. Y. Resveratrol Binding to Fibrinogen and its

Biological Implication. **Food Biophysics**, v. 7, n. 1, p. 35–42, 2012.

ZHANG, M. et al. Fasting exacerbates hepatic growth differentiation factor 15 to promote fatty acid β -oxidation and ketogenesis via activating XBP1 signaling in liver. **Redox Biology**, v. 16, n. September 2017, p. 87–96, 2018.

ZHANG, Y. et al. Effect of indomethacin and lactoferrin on human tenocyte proliferation and collagen formation in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, n. 2, p. 301–307, 2014.

ZHANG, Y.; LIMA, C. F.; RODRIGUES, L. R. Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 12, p. 763–773, 2014.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Binding between bixin and whey protein at pH 7.4 studied by spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1880–1886, 2012.