



Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos (SIMPRONAT-PT)



Partial purification and characterization by fluorimetry and spectrophotometry of buffalo lactoferrin

Autores: Mr. Edson Ferreira da Silva – UFAL

Mr. Milena Bandeira de Melo - UFAL

Marta Ramos Lima - UFAL

Dr. José Leandro da Silva Duarte –UFAL

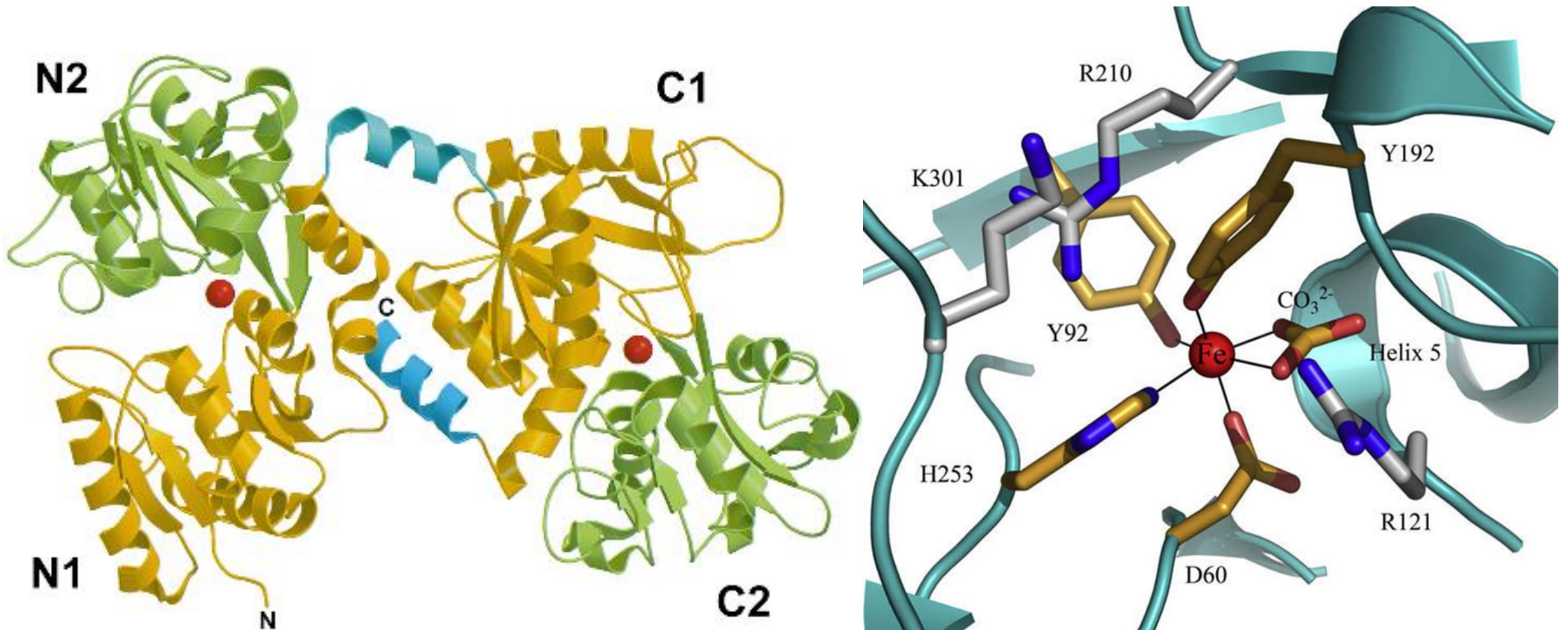
Prof.^a Dr.^a Carmem Lucia de Paiva e Silva Zanta - UFAL

Prof.^a Dr.^a Sonia Salgueiro Machado - UFAL

Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino - UFAL

Maceió-AL,
Novembro / 2021

LACTOFERRINA



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. c

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.

FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA LACTOFERRINA

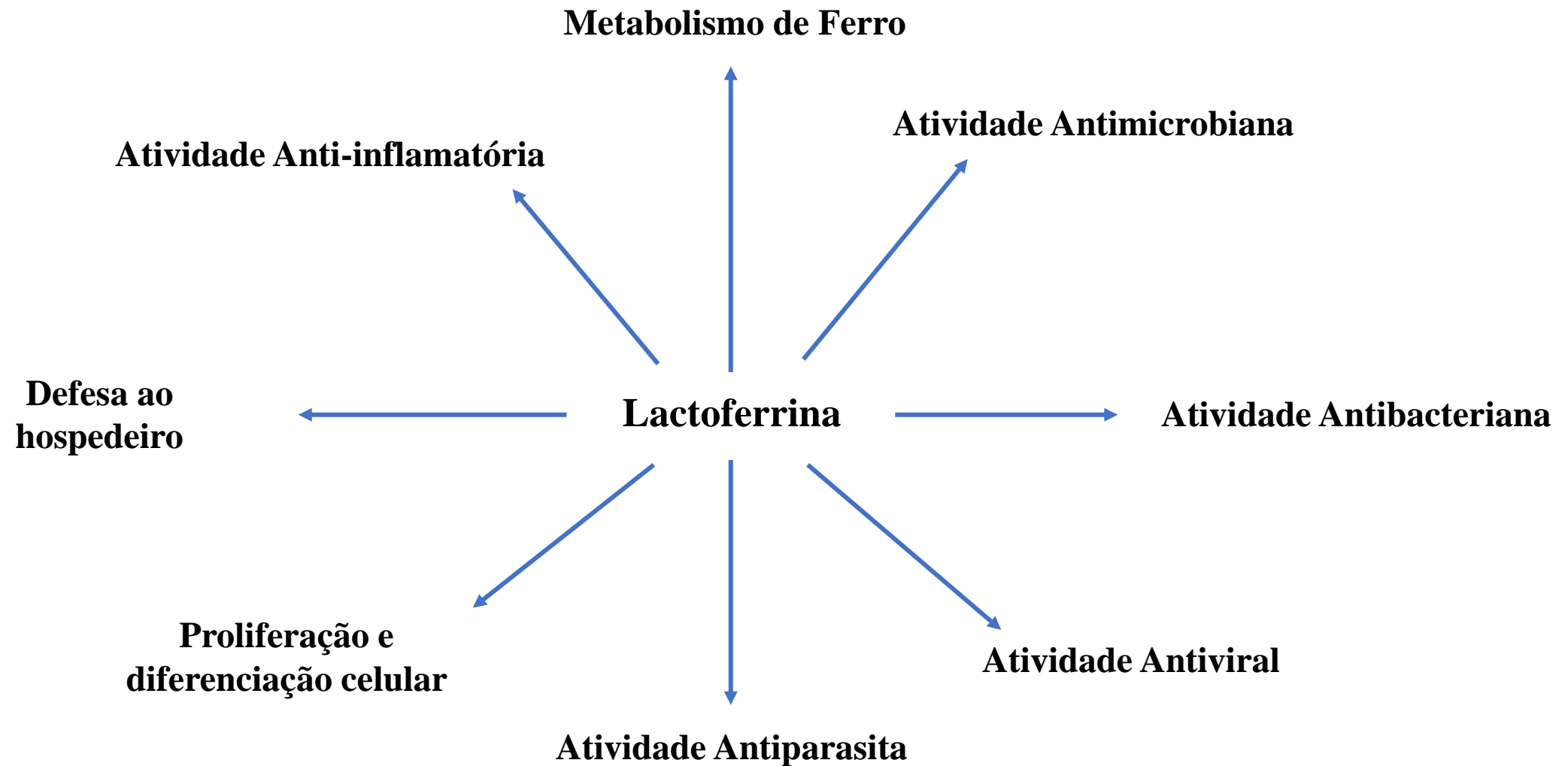


Figura 3. Funções biológicas da lactoferrina

OBJETIVOS GERAIS

1. Objetivo:

Purificar e caracterizar a lactoferrina do leite de búfala, monitorando a purificação por técnicas de fluorimetria e espectrofotometria UV-vis, além de investigar a interação da proteína com o fármaco amoxicilina.

METODOLOGIA

Processamento do leite

- Remoção da gordura;
- Acidificação do leite ao pH 4.6;
- Neutralização do soro a pH 6.8.

Precipitação salina das proteínas do soro por salting out

- Adição de sulfato de amônia;
- Remoção dos precipitados por centrifugação;
- Dialisados com tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 7.7;
- Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford (1976).

Estudos Fluorimétricos

- Comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300 - 550 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006).

Purificação

- Coluna Sephagryl S-100 (1x60 cm) com fluxo de 0,1 mL/min, volume de leito de 50 mL. Tampão fosfato 0,2 M pH 7.7.
- Cromatografia de Absorvância a 280 nm.

Estudos Fluorimétricos

- Comprimentos de onda de excitação e emissão de 295 nm e 300 - 550 nm, respectivamente (CHEN et al., 2006).

Eletroforese SDS-PAGE

Laemmli (1970)

Estudos Espectrofotométricos

Espectros de absorção máxima de UV-vis com amoxicilina.

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

Tabela 1. Concentração de proteínas nas frações salinas no perfil de precipitação salina em excesso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ (*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

* 500 μL tampão fosfato

**300 μL tampão fosfato

***1000 μL tampão fosfato

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

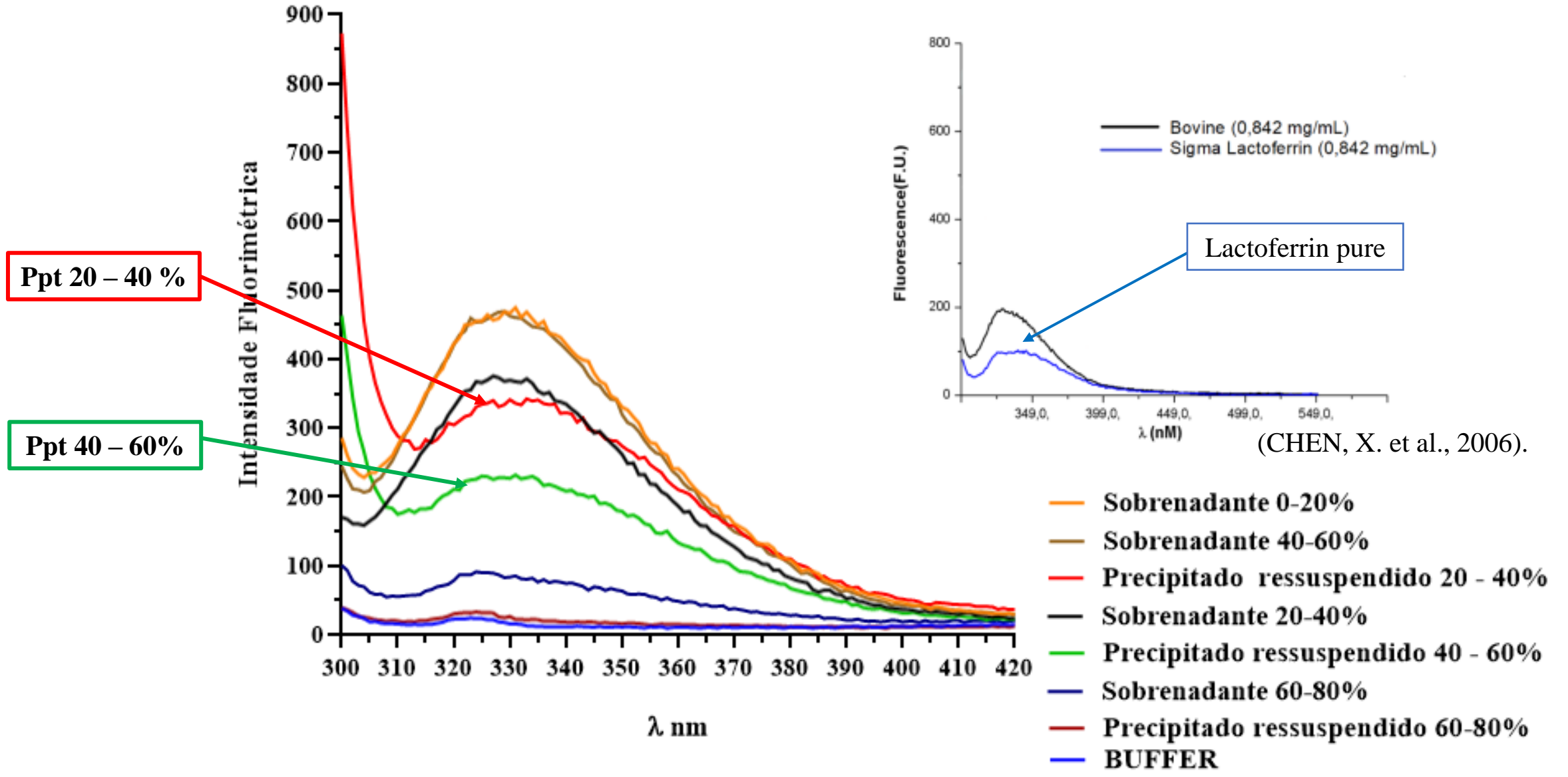


Figura 4. Espectro de fluorescência de lactoferrina bubalina das frações salinas dos perfis de precipitação salina (*salting-out*) (pH 7, 290 nm).

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

Pico 1: Frações (12-16)

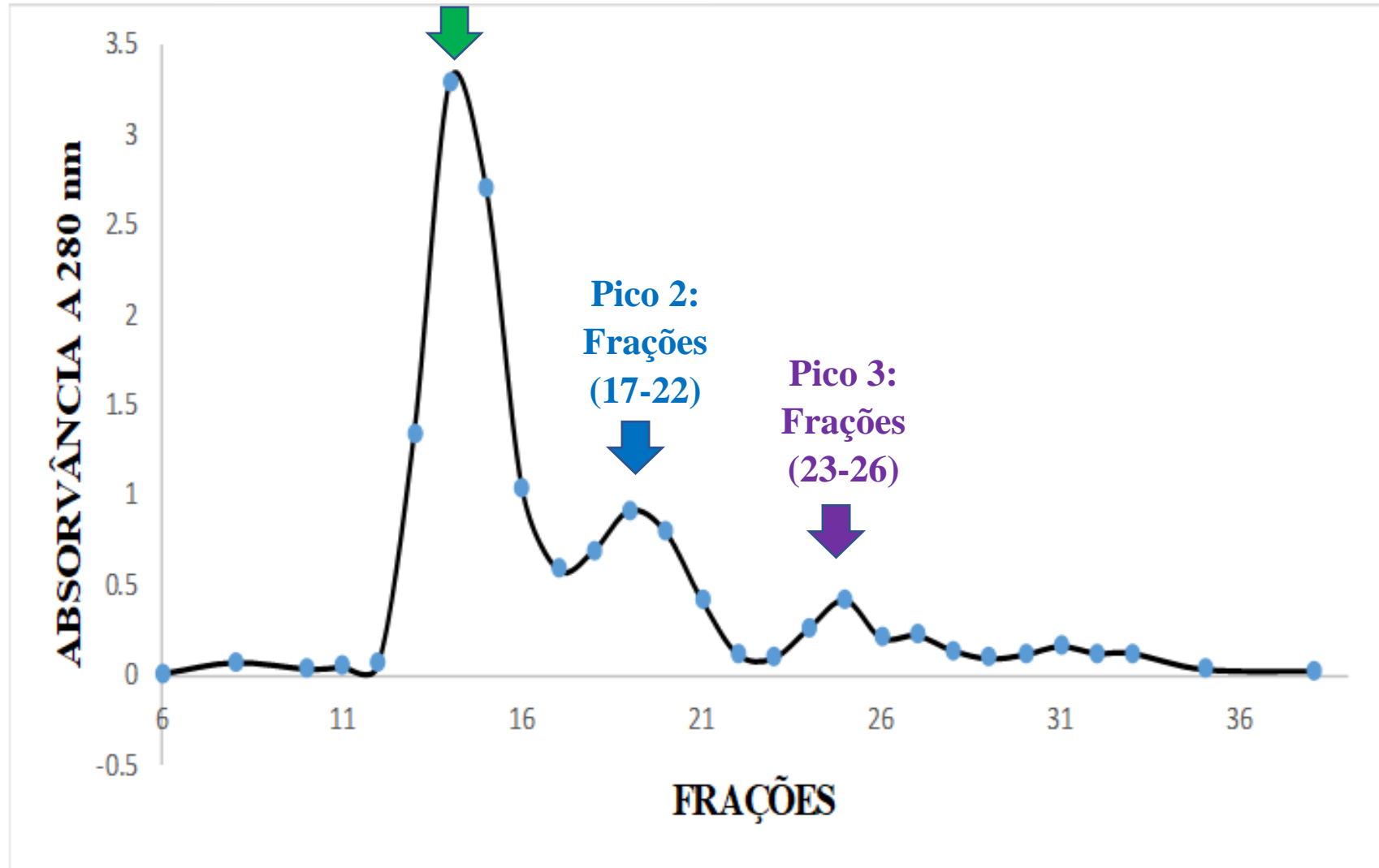


Figura 5. Perfil Cromatográfico da absorvância à 280 nm de eluição do precipitado ressuspensionado 40 – 60% (300µL) durante a eluição em cromatografia líquida com coluna Sephacryl S-100.

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

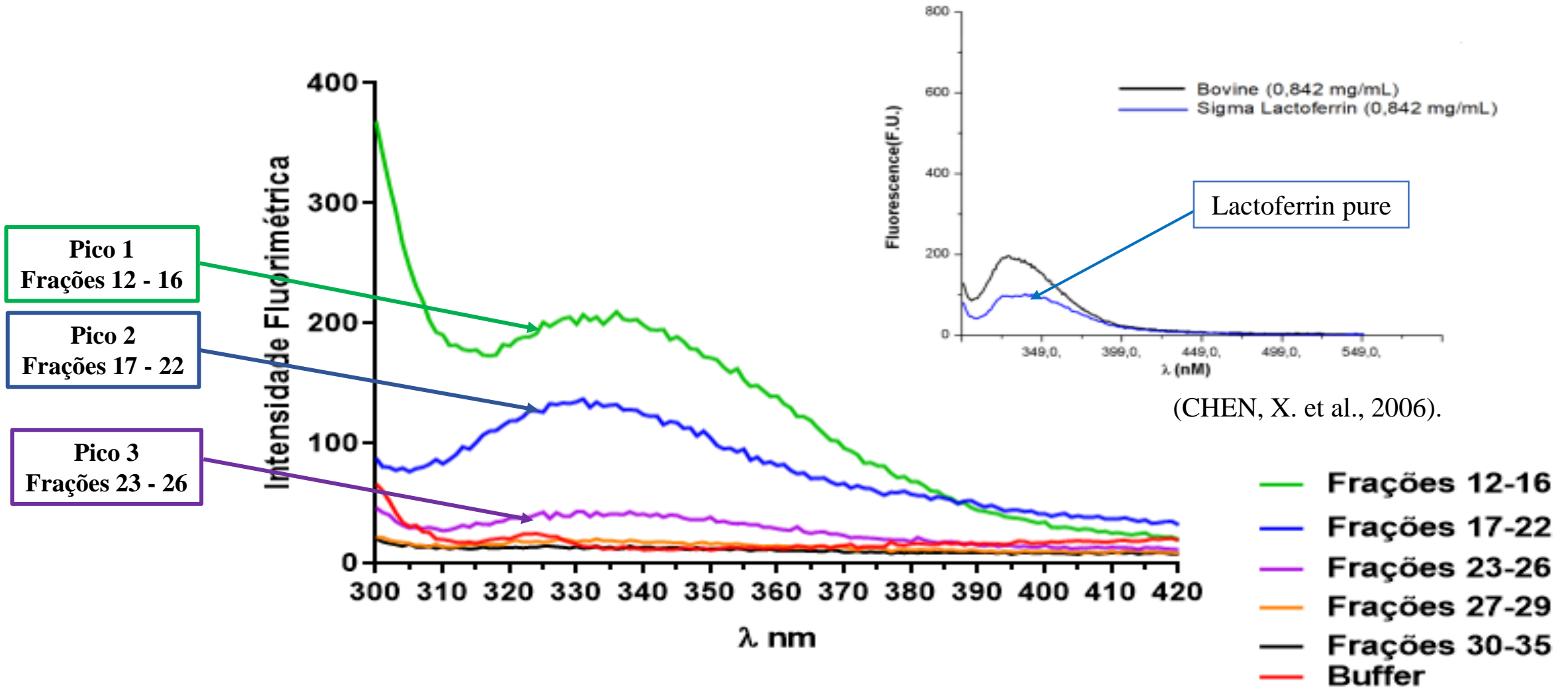


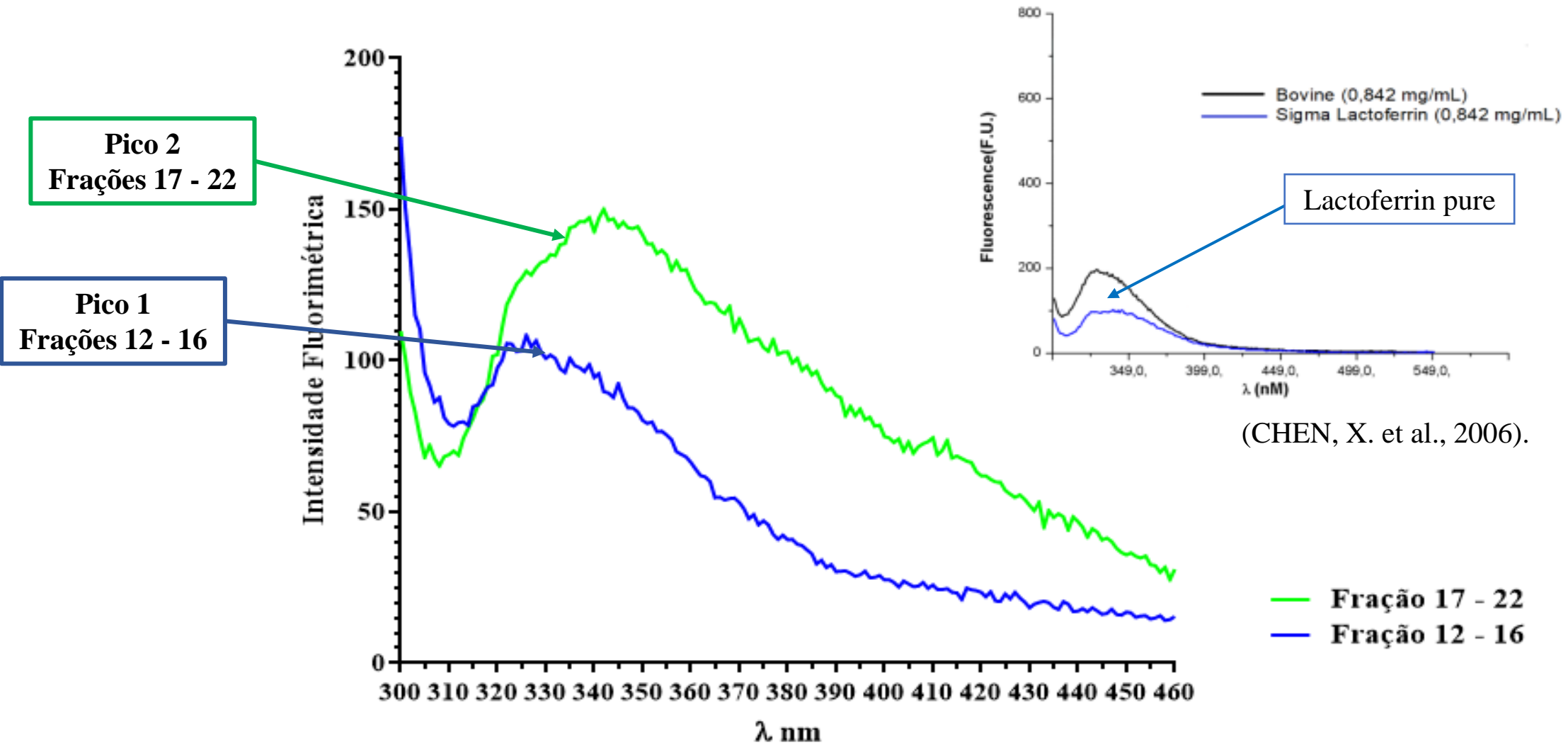
Figura 5. Espectros de fluorescência da eluição das frações eluidas e reunidas do pico 1 (frações 12-16), pico 2 (frações 17-22) e pico 3 (frações 23-26) em cromatografia filtração em gel Sephacryl S – 100 (pH, 7; 290nm).

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

Tabela 2. 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	-	-

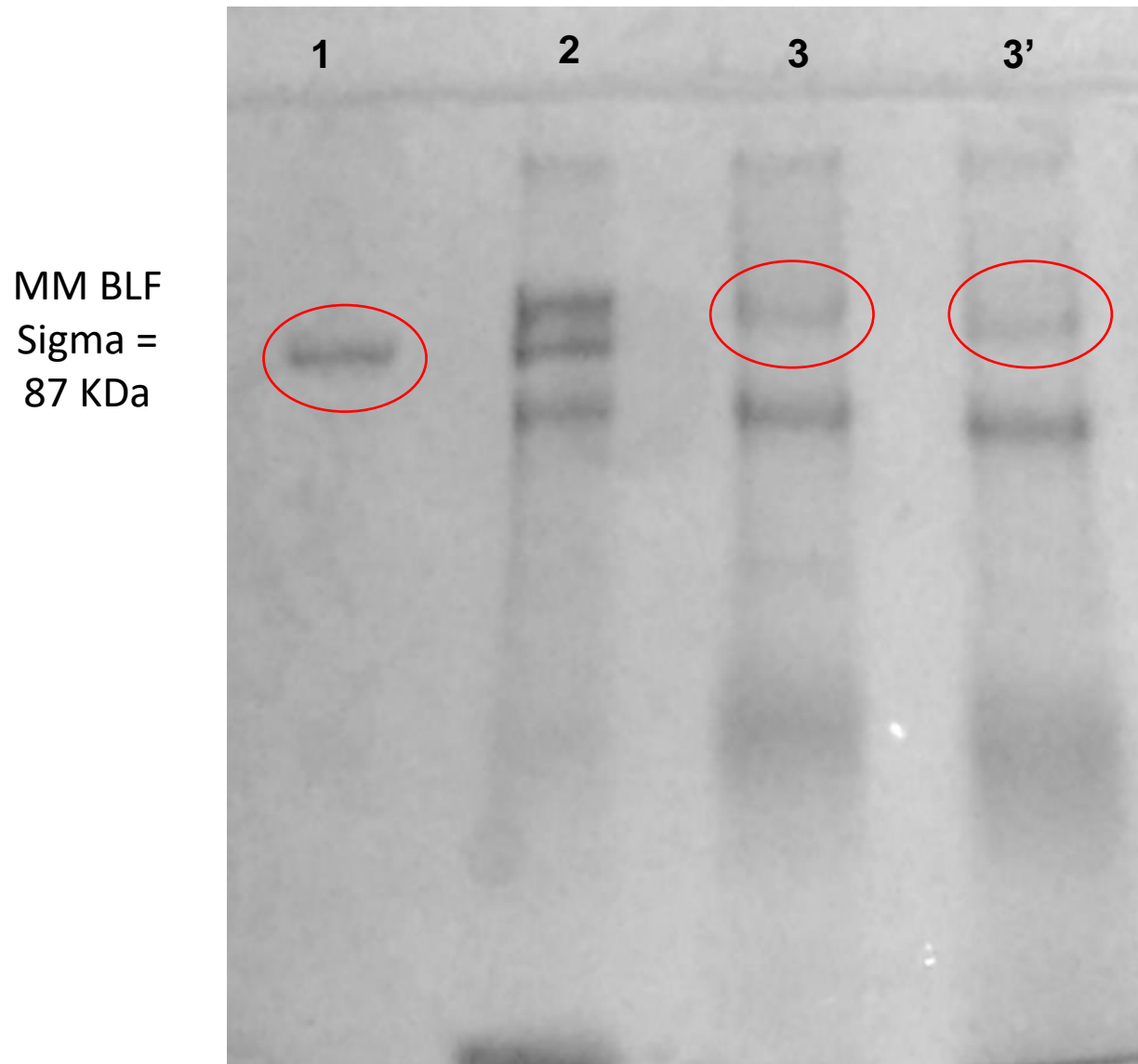
RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA



(CHEN, X. et al., 2006).

Figura 6. Espectros de fluorescência dos picos 1 e 2 após passar no concentrador de proteínas.

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA



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).

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

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

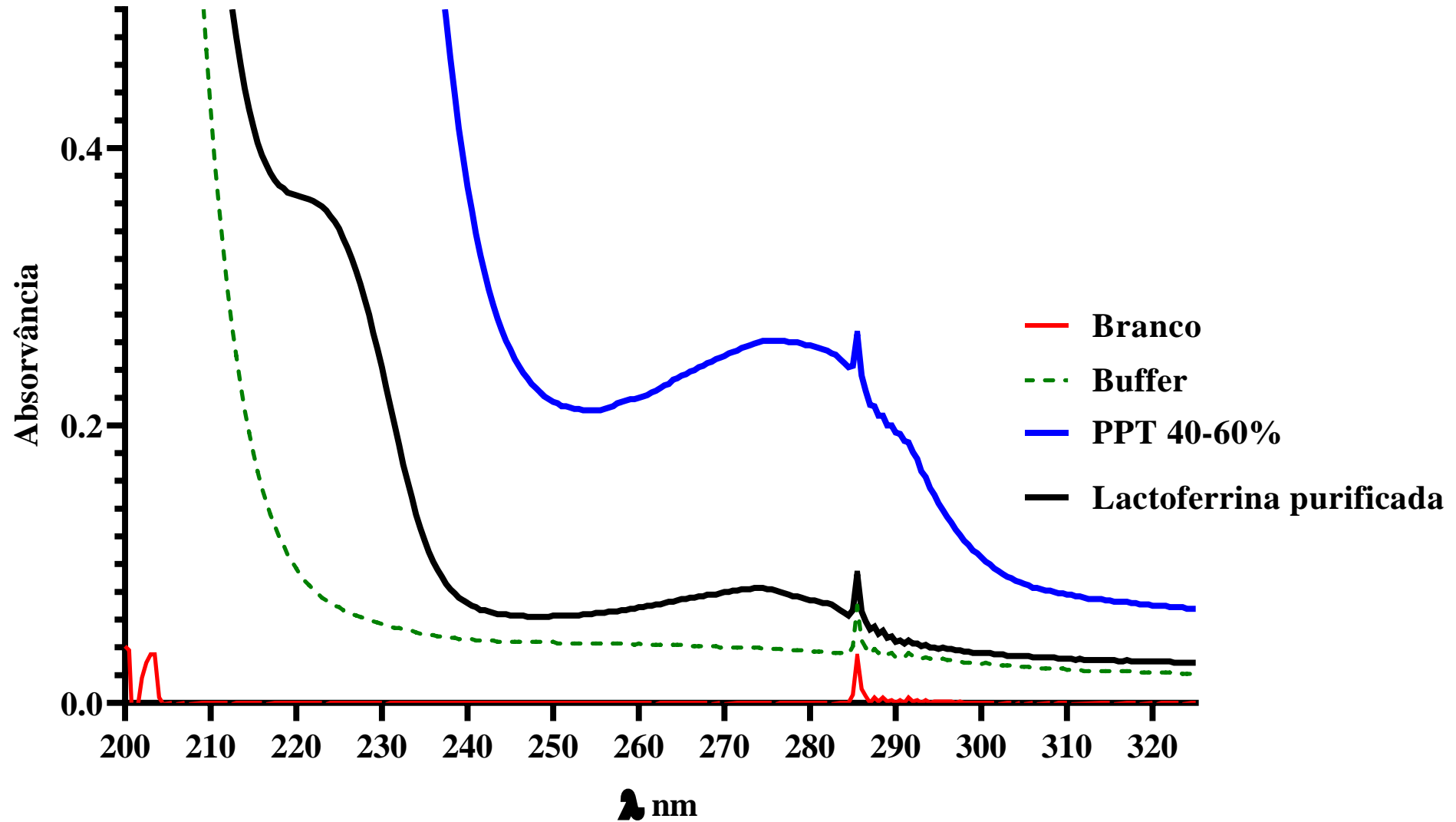


Figura 8. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina parcialmente purificada (0,421 mg/mL), do precipitado ressuspendido dialisado 40-60% na concentração de 0,421 mg/mL.

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

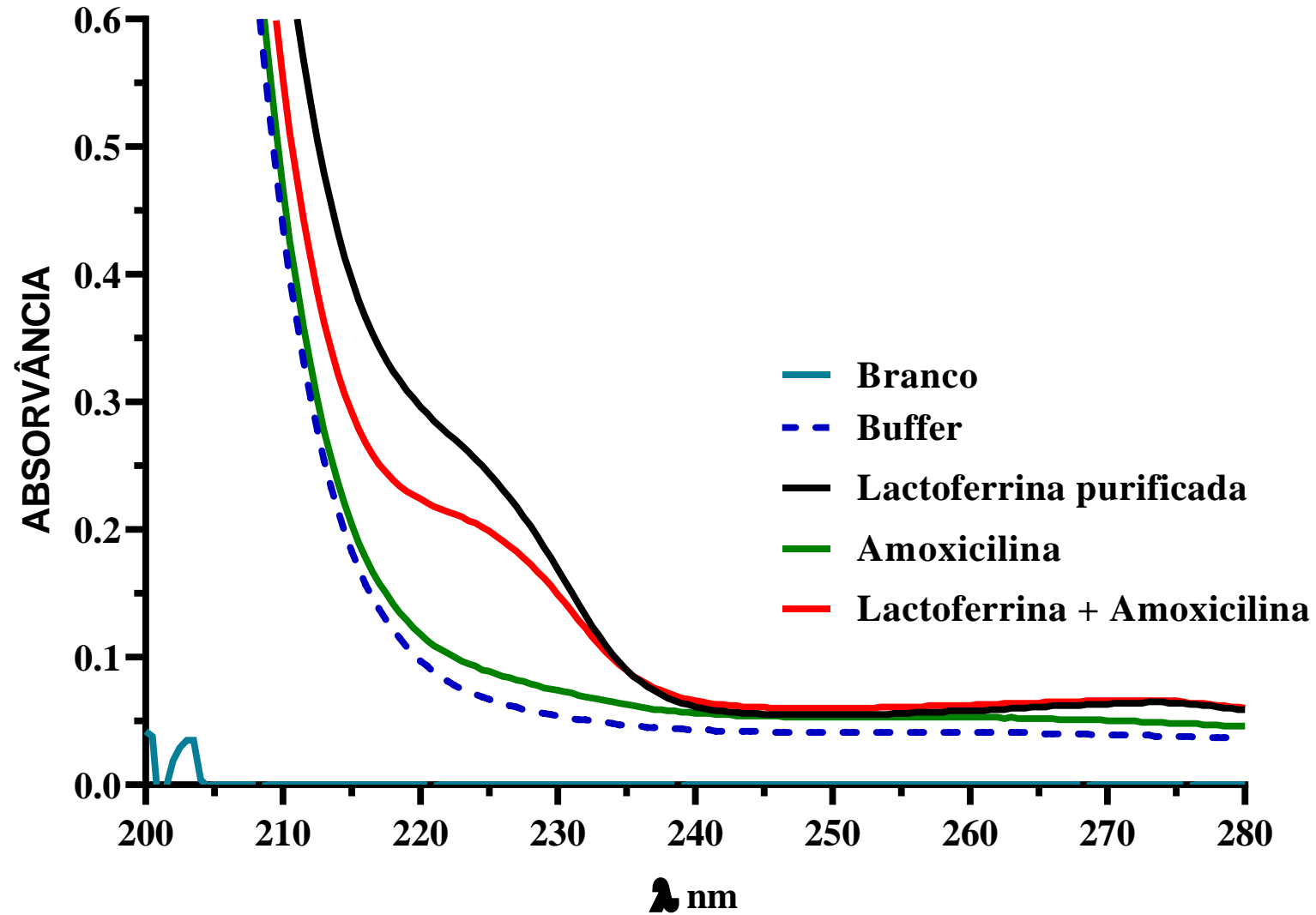


Figura 11. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina parcialmente purificada ($0,421 \text{ mg/mL}$), amoxicilina ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e a lactoferrina acoplada com a amoxicilina.

RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

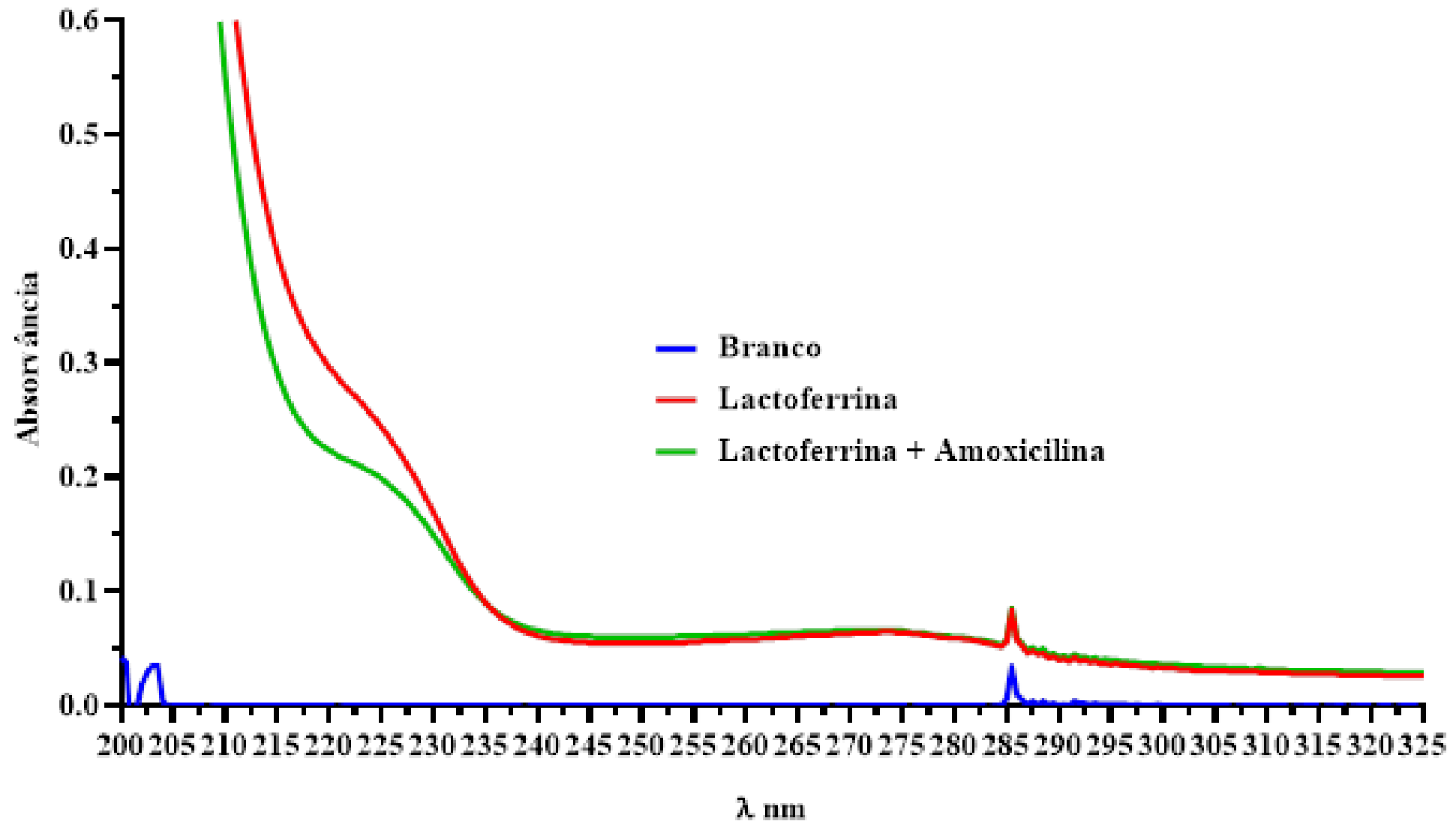


Figura 12. Espectro UV-visível das amostras das frações eluída da cromatografia líquida Sephacryl S-100 da lactoferrina parcialmente purificada (0,421 mg/mL) e a lactoferrina acoplada com a amoxicilina.

CONCLUSÃO

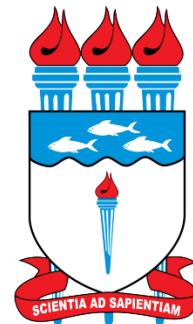
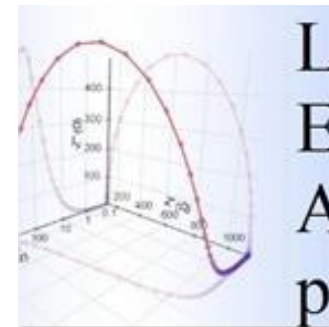
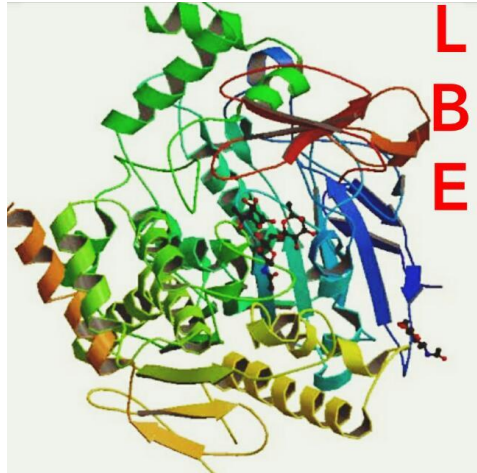
- A Lactoferrina de bubalino pode ser monitorada por estudos fluorimétricos em condições de excitação de 290 nm e emissão de comprimento de onda de 300 – 550 nm.
- É possível realizar o monitoramento do isolamento e purificação da lactoferrina bubalina na faixa de espectros UV-visível de absorção registrados de 190 - 450 nm.
- A Lactoferrina bubalina foi parcialmente purificada por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100) apresentando no pico 1 (frações reunidas 12 a 16) tem massa maior que 87 kDa (massa molecular de BLF Sigma).
- Em ensaios de Lf purificada parcialmente incubada com amoxicilina, observou-se um desvio para o vermelho de 222,50 nm para 225 nm seguido pelo efeito hipocrômico no espectro UV-vis de absorção máxima de lactoferrina.
- Os estudos de espectro de absorção no UV-visível mostraram que a amoxicilina quando associada à lactoferrina induziu alterações na estrutura da proteína.

REFERÊNCIAS

- 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. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 2531–2539, 2005.
- CHEN, X. et al. Fluorometric Study on the Interaction between Lomefloxacin and Bovine Lactoferrin. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 427–430, 2006.
- KARAV, S. et al. Studying lactoferrin N-glycosylation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1–14, 2017.
- LEGRAND, D. et al. Lactoferrin Structure and Functions. In: BÖSZE, Z. (Ed.). . **Bioactive Components of Milk**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 163–194.
- 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.
- YOSHIDA, S. et al. Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2211–2215, 2000.
- HUANG, J. et al. Studies on the Interaction between Three Small Flavonoid Molecules and Bovine Lactoferrin. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

- SERRANO, G. et al. Liposomal Lactoferrin as Potential Preventative and Cure for COVID-19. **International Journal of Research in Health Sciences**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2020.
- 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.
- KIM, K. S. et al. Purification and characterization of mongolian mare lactoferrin. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 29, n. 2, p. 164–167, 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- JAHANI, S.; SHAKIBA, A.; JAHANI, L. The Antimicrobial Effect of Lactoferrin on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **International Journal of Infection**, v. 2, n. 3, 2015.
- FLORES-VILLASEÑOR, H. et al. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFc_{ampin} and LFc_{chimera} on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **BioMetals**, v. 23, n. 3, p. 569–578, 2010.

AGRADECIMENTOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE ALAGOAS**



Instituto de Química e Biotecnologia