



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS  
CENTRO DE CIÊNCIAS INTEGRADAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**LUCAS EMANUEL OLIVEIRA SABINO**

**COMPLEXOS LIPÍDICO-PROTEICOS E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR  
FTIR E HPLC-DAD**

**Araguaína, TO**

**2023**

**Lucas Emanuel Oliveira Sabino**

**Complexos lipídico-proteicos e caracterização química por FTIR e HPLC-DAD**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Campus de Ciências Integradas para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ednilson dos Santos Niculau.

**Araguaína, TO**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- S116c Sabino, Lucas Emanuel Oliveira.  
COMPLEXOS LIPÍDICO-PROTEICOS E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA  
POR FTIR E HPLC-DAD. / Lucas Emanuel Oliveira Sabino. – Araguaína, TO,  
2023.  
45 f.  
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Araguaína - Curso de Química, 2023.  
Orientador: Ednilson dos Santos Niculau  
1. Química. 2. Caracterização química. 3. Câncer. 4. Complexos lipídico-  
proteicos. I. Título

**CDD 540**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da  
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**Lucas Emanuel Oliveira Sabino**

**Complexos lipídico-proteicos e caracterização química por FTIR e HPLC-DAD**

Monografia apresentada à UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins – Centro de Ciências Integradas, Curso de Licenciatura em Química foi avaliado para a obtenção do título de Licenciado em Química e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 13/12/2023

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau, UFNT

---

Prof. Dra. Renata Ferreira Lins da Silva, UFNT

---

Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva, UFNT

Ao futuro.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Ednilson dos Santos Niculau pelos anos de parceria no trabalho e na Iniciação Científica.

Aos professores do colegiado de Química: Flamys, Francisco, Renata, Paiva, Niculau, ambos “Daniéis”, Jane, Verenna, Josilãna, Luciane e Adriana. Especialmente aos inestimáveis técnicos Gildeth, Gilberto e Ana Rosa pelo apoio imprescindível nesses anos.

Aos meus companheiros de graduação, mesmo àqueles que já não estão tão próximos, que sem seu apoio, todo esse processo seria bem mais difícil. Obrigado, Adrielle, Bianca, Brenda, Raylander, Luis Felipe, Sabrina, Jullyanne, Martha, Mateus, Gabriely, Natália, Milene, Jully, Maksueny, Mirella e Fernanda.

Aos meus colegas do PET e o seu Tutor, Wagner dos Santos Mariano, que me acolheram durante dois anos incríveis de experiências que compartilhamos. Obrigado Walisson, Talita, Arthur, Luis Vinicius, Agatha, Karen, Eduardo, Erik e Dionata.

Aos meus amigos que me acompanham desde o ensino fundamental: Ana, Iza, Mariana, Ryhan e Tania. Vocês moram no ventríloquo esquerdo do meu coração.

Ainda estendo meus agradecimentos a muitos outros que direta ou indiretamente contribuíram à minha formação e influenciaram a chegar nesse momento tão importante da minha vida. Obrigado.

## RESUMO

Notadamente, o leite desempenha um papel crucial na saúde animal dos mamíferos, proporcionando substâncias com propriedades antibacterianas, estimulando a atividade imunológica e promovendo o crescimento. As proteínas presentes no leite são divididas em duas categorias principais: caseínas e whey protein, sendo que este último inclui proteínas como beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina. Outra classe de substâncias essenciais são os ácidos graxos livres desempenham funções essenciais no organismo humano, incluindo a geração de energia, a construção de células, glândulas e hormônios. Pesquisas indicam que complexos proteico-lipídicos possuem atividades anticâncer em várias linhagens de células cancerígenas. Este estudo, realizado ao longo de dois anos durante um projeto de Iniciação Científica, teve como objetivo a síntese e caracterização desses complexos, comparando os resultados com a literatura. Os objetivos do estudo incluíram o isolamento do whey protein do leite bovino, a síntese do oleato de sódio e a formação de complexos entre o whey protein e o ácido oleico ou o oleato de sódio, seguido pela caracterização química dos complexos. A caracterização dos complexos foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Os resultados demonstraram o sucesso no isolamento do whey protein e na síntese do oleato de sódio. A análise por FTIR foi eficaz na caracterização dos complexos, evidenciando diferenças nas bandas de absorção em relação aos grupos funcionais presentes. As análises por HPLC-DAD evidenciaram a presença de oleato de sódio no UV com pico máximo de absorção em 203 nm. Este estudo ofereceu uma abordagem simplificada e acessível para a síntese dos complexos, com potencial aplicação futura em larga escala, caso sua atividade anticâncer seja comprovada.

**Palavras-chaves:** HPLC-DAD. Whey protein. Ácidos graxos. Complexos químicos. FTIR.

## ABSTRACT

Notably, milk plays a crucial role in the health of mammals, providing substances with antibacterial properties, stimulating immune activity, and promoting growth. The proteins in milk are divided into two main categories: caseins and whey protein, with the latter including proteins such as beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. Free fatty acids perform essential functions in the human body, including energy generation, cell, gland, and hormone construction. Research indicates that proteolipid complexes exhibit anticancer activity in various cancer cell lines. This study, conducted over a two-year period as part of a Scientific Initiation project, aimed to synthesize and evaluate these complexes, comparing the results with specialized literature. The study's objectives included the isolation of whey protein from bovine milk, the synthesis of sodium oleate, and the formation of complexes between whey protein and oleic acid or sodium oleate, followed by chemical characterization of the complexes. Characterization of the complexes was performed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). The results demonstrated the successful isolation of whey protein and the synthesis of sodium oleate. FTIR analysis was effective in characterizing the complexes, revealing differences in absorption bands related to functional groups. HPLC-DAD analysis showed maximum absorption at 203 nm. This study offered a simplified and accessible approach to complex synthesis, with potential future applications on a larger scale if their anticancer activity is confirmed.

**Keywords:** HPLC-DAD. Whey protein. Fatty acids. Chemical complexes. FTIR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração do processo de complexação (BAMLET) com a adição de ácido oleico. .....	20
Figura 2 – Formação da estrutura tridimensional das proteínas a partir das ligações com aminoácidos. ....	20
Figura 3 - Estrutura tridimensional da alfa-lactoalbumina. <i>A</i> representa o domínio $\beta$ e <i>B</i> representa o domínio $\alpha$ . Os números romanos indicam as pontes de dissulfeto. ....	21
Figura 4 - Ampliação do sítio de ligação de Ca(II). Os grupos coordenadores de Ca(II) em amarelo (carboidratos K79 e D84, sublinhados, e cadeias laterais carboxilato D82, D87 e D88). Ca(II) é vermelho e as moléculas de água coordenadoras de Ca(II) estão em ciano. ....	21
Figura 5 - Diagrama do isolamento do whey protein. ....	24
Figura 6 - Whey protein isolado da Vitafor®. ....	24
Figura 7 - Diagrama da síntese do oleato de sódio. ....	25
Figura 8 - Diagrama da síntese dos complexos de whey protein com ácido oleico ou oleato de sódio. ....	26
Figura 9 - Whey protein isolado. O líquido esverdeado é o sobrenadante que abriga a maior quantidade de ALA e o sólido precipitado é a porção de caseínas. ....	28
Figura 10 - Whey protein desidratado. <i>a</i> corresponde ao whey protein do leite desnatado e <i>b</i> do integral. ....	29
Figura 11 - Complexos com oleato de sódio. <i>a</i> corresponde BAMLET com leite desnatado e <i>b</i> com leite integral. ....	29
Figura 12 – Complexo com whey integral + ácido oleico. ....	30
Figura 13 - Espectro IV para o oleato de sódio. ....	30
Figura 14 - Espectro IV para o ácido oleico. ....	31
Figura 15 – Espectros IV para <i>A</i> whey protein integral e <i>B</i> para o complexo BAMLET (whey integral + oleato de sódio). ....	32
Figura 16 - Espectros IV para <i>A</i> o whey protein desnatado e <i>B</i> complexo BAMLET (whey desnatado + oleato de sódio). ....	33
Figura 17 - Espectro IV para <i>A</i> complexo BAMLET com ácido oleico e whey desnatado e <i>B</i> para o complexo BAMLET whey integral com ácido oleico. ....	34
Figura 18 - Espectro IV para o whey protein comercial. ....	35

Figura 19 - Espectro IV para A whey comercial + ácido oleico e B para o whey comercial + oleato de sódio. ....	35
Figura 20 - Cromatograma do BAMLET desnatado com oleato de sódio em metanol a 0,106 mg/mL. ....	36
Figura 21 – Pico de absorção máxima da banda de absorção do oleato de sódio em 203 nm. ....	36
Figura 22 - Cromatograma do ácido oleico 0,2 mg/mL com um 1% de ácido acético. ....	37
Figura 23 - Pico de absorção máxima da banda de absorção do ácido oleico em 195 nm. ....	37
Figura 24 – Sobreposição dos cromatogramas <i>em rosa</i> do BAMLET desnatado em metanol a 0,106 mg/mL e <i>em preto</i> do ácido oleico a 0,2 mg/mL com ácido acético 1%. ....	38
Figura 25 - Cromatograma do oleato de sódio 0,106 mg/mL em metanol. Fase móvel HPLC: água/ácido acético/Metanol isocrático. ....	38
Figura 26 - Pico de absorção máxima da banda de absorção do oleato de sódio em 203 nm. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	alfa-Lactoalbumina
AO	Ácido oleico
BAMLET	Bovine $\alpha$ -Lactalbumin Made LEthal to Tumor cells
DSA	Ácido 5-doxilseárico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HAMLET	Human $\alpha$ -Lactalbumin Made LEthal to Tumor cells
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Histórico .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>HAMLET e BAMLET .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Mecanismos de ação dos complexos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Síntese dos complexos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Biomoléculas e a alfa-lactoalbumina.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolamento do whey protein.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Whey protein comercial.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Síntese do oleato de sódio.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Síntese do complexo whey-ácido oleico.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntese do complexo whey-oleato de sódio .....</b>	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) .....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Isolamento dos whey protein e sínteses dos complexos .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise por FTIR.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise por HPLC-DAD .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CRONOGRAMA.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O leite tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu impacto na saúde humana e especialmente nos recém-nascidos, e tem uma importância significativa na qualidade e manutenção de vida; ele provê substâncias que promovem o combate às bactérias, aumenta a atividade imunológica e auxilia no crescimento. Por esses motivos, ele tornou-se um material de interesse para a comunidade científica na investigação de seus componentes (GILLIN; REINER; WANG, 1983; MARSHALL, 2004; SUN *et al.*, 2012).

Em geral, o leite é dividido em dois grupos: o grupo de caseínas e de whey. A porção de caseína compõe 80% da massa do leite aproximadamente, enquanto o whey compõe os outros 20%. O whey protein (ou somente whey)<sup>1</sup> é uma mistura altamente concentrada das proteínas beta-lactoglobulina (ausente no leite humano), alfa-lactoalbumina, imunoglobulinas e lactoferrinas. Elas também são encontradas em suplementos alimentares e outros alimentos (SUN *et al.*, 2012).

Outra classe de biomoléculas bastante importante para o metabolismo são os ácidos graxos livres, tomam parte em diversos processos fisiológicos do corpo humano (COPPACK; JENSEN; MILES, 1994). De acordo com Costanzi, Neumann e Gershengorn (2008), os ácidos graxos dão energia – a partir de reações de oxirredução – aos diversos processos do metabolismo. Os ácidos graxos são substâncias essenciais na constituição das células, glândulas e hormônios. Desequilíbrio nos níveis de ácidos graxos podem levar a diversas consequências como câncer, levar a diabetes tipo 2 e aterosclerose (COSTANZI; NEUMANN; GERSHENGORN, 2008; HO *et al.*, 2013).

Estudos anteriores indicam que complexos proteico-lipídicos, formados entre as proteínas do leite humano e bovino com ácidos graxos e seus sais, demonstraram notável atividade anticâncer em diversas linhagens de células cancerígenas (HO *et al.*, 2013; PERMYAKOV *et al.*, 2011; RAMMER *et al.*, 2010; RATH *et al.*, 2018, 2014; TOLIN *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2013).

---

<sup>1</sup> Whey protein ou soro do leite.

Nesse contexto, o presente estudo, desenvolvido ao longo de dois anos durante um projeto de Iniciação Científica, buscou aprofundar a compreensão desses complexos químicos, realizando a síntese deles de forma acessível e comparando os resultados com a literatura.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver compostos químicos, complexos moleculares, potenciais atividades biológicas nos seres vivos, principalmente atividades anticâncer e antimicrobiana.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Isolar whey protein de leite bovino;
2. Sintetizar oleato de sódio;
3. Sintetizar complexos de whey protein do leite bovino com oleato de sódio e ácido oleico;
4. Sintetizar complexos de whey protein comercial com oleato de sódio e ácido oleico;
5. Caracterizar quimicamente os complexos formados por HPLC-DAD e FTIR.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

De acordo com vários estudos citoquímicos, há alguma evidência para a possível atividade anticarcinogênica do leite humano e dois complexos proteico-lipídicos formados pela alfa-lactolbumina (humana e bovina) e pelo ácido oleico, denominados HAMLET e BAMLET, respectivamente (FISCHER *et al.*, 2004; HÅKANSSON *et al.*, 1995; PUTHIA *et al.*, 2014). Há outros estudos que apontam para a mesma atividade anticarcinogênica para complexos entre alfa-lactoalbumina (ALA) e o sal orgânico do ácido oleico, o oleato de sódio (DELGADO *et al.*, 2015; XIAO *et al.*, 2013).

#### 3.1 Histórico

As proteínas presentes no leite fornecem à este alimento o status de um agente antimicrobiano e, por esse motivo, é fundamental para a saúde dos recém-nascidos (GILLIN; REINER; WANG, 1983). Dados estatísticos demonstram que a incidência de câncer em recém-nascidos alimentados com leite materno diminuiu significativamente, evidenciando o papel crucial do leite materno na homeostase dos bebês, embora os mecanismos exatos ainda não sejam completamente compreendidos (SVENSSON *et al.*, 2000). As proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina (presente somente no whey bovino) apo-lactoferrina e homo-lactoferrina que constituem o *whey* do leite apresentam capacidade antimicrobiana (SUN *et al.*, 2012).

Foi nesse sentido que Håkansson e colaboradores buscaram estudar melhor a atividade antibacteriana do leite humano (HÅKANSSON *et al.*, 1995). Por acidente, eles detectaram a indução de apoptose – morte celular programada – em células cancerígenas do pulmão (linhagem A549) quando expostas ao leite humano e concluíram que o composto principal responsável pela apoptose foi a alfa-lactoalbumina.

Estudos *in vitro* realizados com diferentes tipos celulares para averiguar a sensibilidade da alfa-lactoalbumina, mostram que ela foi capaz de reduzir a viabilidade de células epiteliais humanas, células dos rins de primatas e células de camundongos em > 90% dessas células. Essa pesquisa promoveu um novo campo de estudo para tratamento de câncer devido ao fato da sua seletividade a células tumorais. Contudo, os pesquisadores apontam que a ALA isolada do leite humano não induziu apoptose às células cancerígenas, e tal motivo foi alvo de novas pesquisas (HÅKANSSON *et al.*, 1995).

Buscando investigar a ausência da citotoxicidade da ALA isolada, Svensson e colaboradores (1999) efetuaram estudos de caracterização química, usando absorvância e fluorescência no UV e dicroísmo circular. Seus resultados apontaram que, a depender do estado conformacional da proteína, suas atividades biológicas se alteram, fazendo com que diferentes resultados biológicos sejam obtidos. Neste caso, em determinada conformação há atividade citotóxica, e em outras não.

Diversos fatores podem explicar a mudança conformacional de macromoléculas, incluindo interações intermoleculares, quebra das pontes de dissulfeto, interações com cátions fortes e o pH do meio. Essas interações podem formar estruturas estáveis semiabertas, abertas ou fechadas. Em pH baixo, a alfa-lactoalbumina forma uma estrutura estável fechada. Diante disso, Svensson e colaboradores (2000) buscaram responder se é possível manter a ALA em uma conformação estável que induza apoptose e os resultados apontaram que isso é possível, utilizando um cofator.

O cofator identificado pelos pesquisadores por meio de GC/MS foram os ácidos graxos C18:1, C16:0 e C14:0, que são respectivamente os ácidos oleico, palmítico e mirístico. Os resultados ainda mostraram que o ácido graxo C18:1 foi o principal responsável pela atividade de indução de apoptose, “assim, nossa hipótese é que o ácido graxo C18:1 se liga na interface entre os domínios alfa e beta, e, dessa forma, estabiliza uma conformação semelhante a um "molten globule" [estrutura amorfa intermediária] (SVANBORG *et al.*, 2003, p. 19). Sua atividade é semelhante à conformação denominada “apo-state” intermediária (PERMYAKOV; BERLINER, 2000) que é a forma parcialmente aberta da ALA formada a pH neutro com cátions removidos, identificada nos estudos de 1995 (HÅKANSSON *et al.*, 1995). Ambas as estruturas oscilam entre as formas secundárias e terciárias da ALA.

Ao realizar a conversão para a forma apo utilizando o ácido oleico, foi possível obter atividades de apoptose satisfatórias, devido à sua maior adesão à membrana plasmática das células e sua posterior translocação para o núcleo. Considerando essas observações, conclui-se que o complexo entre ALA e o ácido oleico, possui um grande efeito sinérgico. A esse complexo deu-se o nome de HAMLET (SVENSSON *et al.*, 2000).

Ao nível *in vitro*, é possível afirmar a capacidade deste complexo em induzir a morte de células tumorais em seus estágios imaturos e prevenir o desenvolvimento maior do neoplasma, que pode tornar-se e câncer. Portanto,

HAMLET apresenta várias características únicas: (1) ele mata células cancerígenas, mas não células saudáveis e diferenciadas; (2) é ativo contra uma ampla variedade de linhagens de células tumorais; (3) mata por apoptose, o que não é tóxico para os tecidos; e (4) é formado a partir do leite humano, em pH baixo, e, portanto, é improvável que provoque efeitos colaterais prejudiciais se administrado como terapia (SVANBORG *et al.*, 2003, p. 4, tradução própria).

### 3.2 HAMLET e BAMLET

Após a comprovação da atividade anticâncer do HAMLET (SVENSSON *et al.*, 2003), estudos com a ALA bovina começaram a surgir concomitantemente com ALA de outros animais como cabras e cavalos (PETTERSSON; MOSSBERG; SVANBORG, 2006), também com outras proteínas presentes no whey bovino, como a beta-lactoglobulina (BARBANA; SÁNCHEZ; PÉREZ, 2011; LIŠKOVÁ *et al.*, 2010; RATH *et al.*, 2018). HAMLET/BAMLET (*human/bovine  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells*) são complexos entre ALA e ácido oleico (C18:1  $\Delta^9$ ) (SVENSSON *et al.*, 2000).

#### 3.2.1 Mecanismos de ação dos complexos

Pesquisadores estudando os mecanismos que levam à morte celular das células condicionadas com HAMLET concluíram que o complexo tem alta afinidade com as histonas – proteínas responsáveis por condensar o DNA no núcleo das células – e impedem a "transcrição, replicação e recombinação" (SVANBORG *et al.*, 2003, p. 12) das células. Além disso, confirmaram que o complexo se liga às mitocôndrias das células malignas, provocando uma reação em cadeia nas caspases – proteínas responsáveis pela morte celular programada –, ativando-as e levando a mitocôndria a liberar o citocromo c (SVANBORG *et al.*, 2003). Esses mecanismos explicariam a ação apoptótica do complexo.

Outra possibilidade levantada pelos pesquisadores (SVANBORG *et al.*, 2003) é que as proteínas p53 e bcl-2 – responsáveis pela manutenção do ciclo celular e da apoptose – não são perturbadas pela presença do HAMLET, o que sugere que o complexo desempenha um papel independente na apoptose quando uma célula é tratada com HAMLET. Em outras palavras, o complexo utiliza outras vias para induzir a apoptose que não estão relacionadas às vias já existentes na célula. Um mecanismo proposto para a ação do BAMLET é a inativação do lisossomo; o complexo foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade da membrana do lisossomo, liberando proteínas tóxicas ao metabolismo celular (RAMMER *et al.*, 2010).

É interessante notar que mesmo com fragmentos da ALA, ou a proteína levemente desnaturada, o complexo apresenta atividade citotóxica, o que sugere que sua ação pode estar

relacionada ao fato de funcionar como um carreador do ácido oleico. Em outro estudo, foi apontado que a citotoxicidade do complexo BAMLET se deve somente à porção do ácido graxo (DELGADO *et al.*, 2015; LIŠKOVÁ *et al.*, 2010). No entanto, como apontam outros pesquisadores (TOLIN *et al.*, 2010), não se deve negar a possível atividade sinérgica que a proteína pode ter, considerando que a própria proteína já induziu a atividade apoptótica.

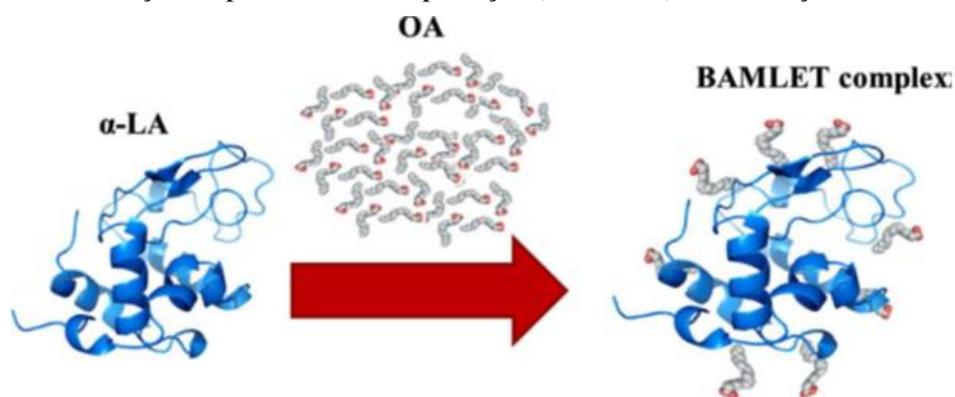
Além disso, sabe-se que as células normais têm menos sensibilidade aos complexos e ao ácido oleico (DELGADO *et al.*, 2015). Ademais, o BAMLET torna-se ideal porque sua fabricação em larga escala é mais fácil de ser realizada, devido ao fato de não existir uma fonte de produção de leite humano, quando melhores estudos e condições apontarem seu uso medicamentoso.

Para além da atividade com ácido oleico, testes com o oleato de sódio (sal orgânico derivado do ácido oleico) também mostra atividade semelhante, com a diferença desse complexo depender mais da concentração de oleato no meio que por sua vez diminui a atividade celular maligna seguindo o aumento da concentração (HO *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Síntese dos complexos

A síntese dos complexos varia levemente de literatura para literatura, mas o método geral pode ser sintetizado como segue. HAMLET e BAMLET foram sintetizados a partir da remoção de Ca(II), para liberar o sítio de Ca(II) para a incorporação do ácido oleico (Figura 1). A remoção de Ca(II) deu-se a partir do uso de EDTA, e a complexação ocorreu em uma matriz de troca iônica condicionada com ácido oleico, com a finalidade de se manter um padrão na síntese para comparar os resultados (SVENSSON *et al.*, 2003). Os pesquisadores purificaram a ALA humana a partir da precipitação da proteína no whey do leite humano usando sulfato de amônio, seguindo de cromatografia de exclusão.

Figura 1 – Ilustração do processo de complexação (BAMLET) com a adição de ácido oleico.

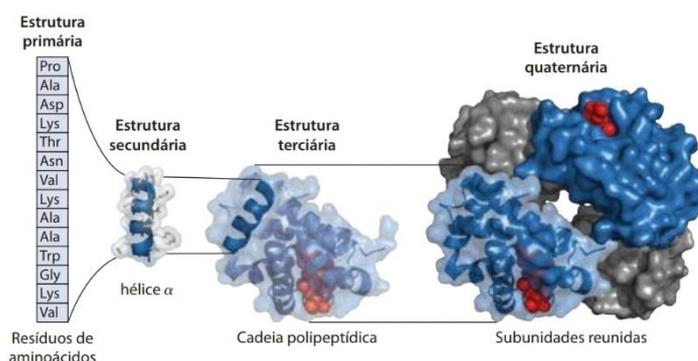


FONTE: Delgado *et al.* (2015, p. 399).

### 3.3 Biomoléculas e a alfa-lactoalbumina

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células eucarióticas, mais do que RNA e DNA, essa circunstância deve-se ao fato delas apresentarem grande biodiversidade e variação em suas estruturas e funções. As proteínas são formadas por ligações peptídicas entre mais de vinte aminoácidos, que variam entre eles mesmos em estrutura, isso confere às proteínas grande variação em sua estrutura tridimensional (Figura 2). Em geral, as proteínas são classificadas em primárias, secundárias, terciárias e quaternárias, e cada conformação promove uma especificidade a estas moléculas, como é o caso das enzimas (SÉRAPHIN, 2005).

Figura 2 – Formação da estrutura tridimensional das proteínas a partir das ligações com aminoácidos.



FONTE: Nelson; Cox (2014).

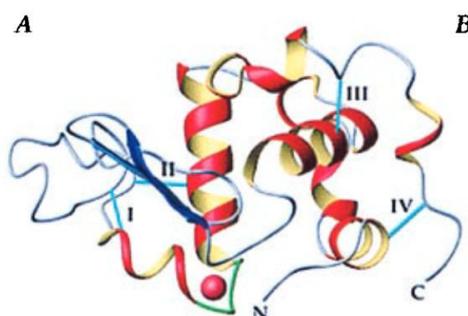
A ALA é uma proteína com massa de 14,2kDa (123 resíduos de aminoácidos) e ácida (Figura 3). Ela faz parte da síntese da lactose, funcionando como uma subunidade da lactose-sintase, que catalisa a biossíntese da lactose na glândula mamária (PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Refere-se comumente à ela como uma proteína que está fortemente ligada

a somente um íon  $\text{Ca(II)}$ , porém, em circunstâncias com elevada quantidade deste íon, a ALA pode ligar-se a um segundo íon  $\text{Ca(II)}$  (CHANDRA; BREW; ACHARYA, 1998).

A ALA possui quatro alfa-hélices e uma folha-beta antiparalela, conectados pela interação com o íon  $\text{Ca}^{2+}$ , que por sua vez está coordenado por oxigênios dos carboxilatos dos resíduos de Asp (82, 87, 88) e duas carbonilas (Figura 4). Ainda apresenta quatro pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura (PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

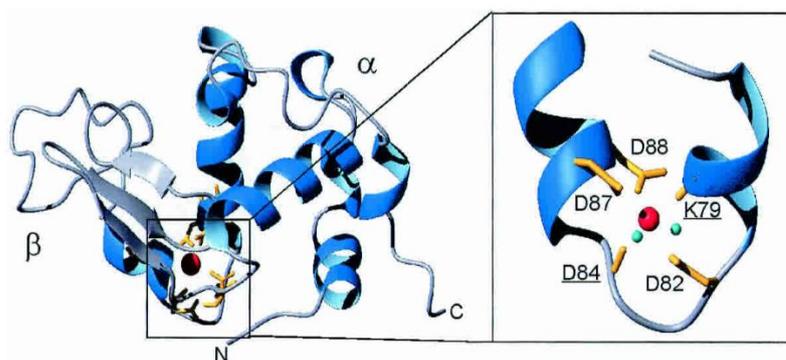
No estado amorfo intermediário da ALA ela retém sua estrutura globular, porém seu raio aumenta de 15,7 Å para 17,2 Å. Essa mudança deve-se ao fato dela estar em um estado de super-hidratação, com 270 moléculas de água ligadas. Essa conformação não foi suficiente para induzir a morte de células (SVANBORG *et al.*, 2003; SVENSSON *et al.*, 2000).

Figura 3 - Estrutura tridimensional da alfa-lactoalbumina. A representa o domínio  $\beta$  e B representa o domínio  $\alpha$ . Os números romanos indicam as pontes de dissulfeto.



FONTE: Svensson *et al.* (2000, p. 4223).

Figura 4 - Ampliação do sítio de ligação de  $\text{Ca(II)}$ . Os grupos coordenadores de  $\text{Ca(II)}$  em amarelo (carboidratos K79 e D84, sublinhados, e cadeias laterais carboxilato D82, D87 e D88).  $\text{Ca(II)}$  é vermelho e as moléculas de água coordenadoras de  $\text{Ca(II)}$  estão em ciano.



FONTE: Svensson *et al.* (2003, p. 2795).

As ALA humana e bovina possuem uma sequência de aminoácidos 76% idêntica, sugerindo uma divergência na formação dos complexos no que tange à ligação do ácido oleico sendo a principal diferença ao redor do sítio de ligação do Ca(II) (RAMMER *et al.*, 2010; SVENSSON *et al.*, 2003).

ALA interage com diversos compostos orgânicos com peso molecular baixo pela interação com o sítio de interação do íon cálcio. Ela pode ligar-se ao UDP-galactose (substrato da reação de síntese da lactose), a melitina (peptídeo do veneno de abelha), e claro, a ácidos graxos como DSA, esteárico, palmítico e oleico. Essas interações dependem da conformação da molécula (PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Outro tipo de interação de relevância da ALA com compostos orgânicos é com membranas lipídicas. A pH 2, a proteína rapidamente se insere na membrana (CAWThERN; PERMYAKOV; BERLINER, 1996; PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Esse comportamento pode ajudar a explicar a atividade *in vitro* dos complexos.

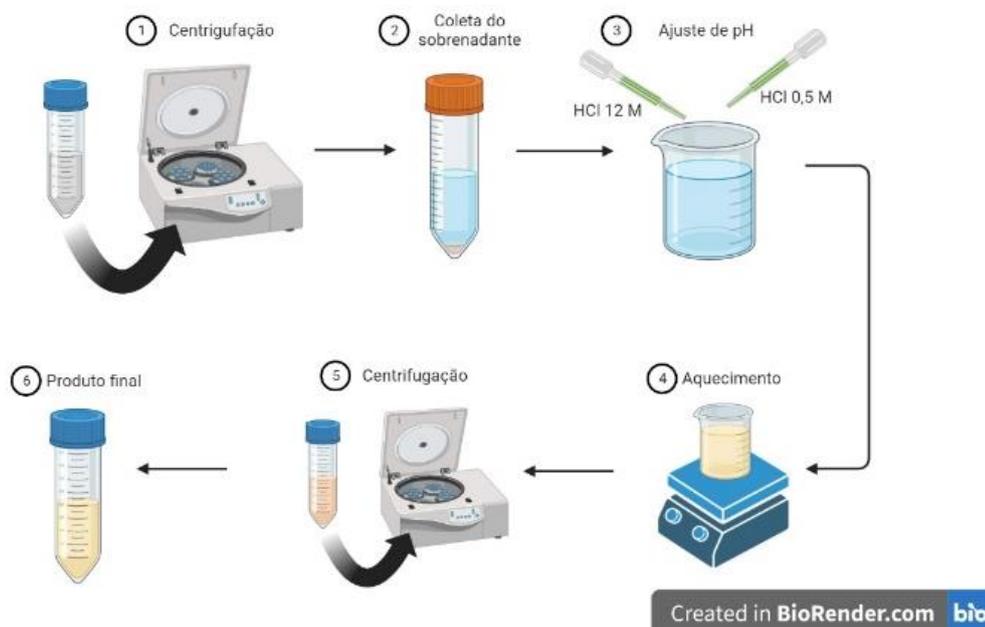
## 4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada para esse trabalho foi adaptada de Boyer (2000, p. 265) por sua simplicidade e eficiência quando comparada aos estudos descritos na seção 3 deste trabalho. Além disso, fatores materiais influenciaram na simplificação dos métodos experimentais para efetuar as sínteses. Os procedimentos descritos abaixo para as sínteses dos complexos foram realizados tanto para o whey protein isolado do leite bovino integral e desnatado quanto para o whey comercial utilizando a metodologia descrita acima adaptada do trabalho de Nadeem, Svanborg e Ho (2019), no qual descrevem o preparo do complexo com oleato de sódio utilizando PBS

### 4.1 Isolamento do whey protein

Para isolar o whey protein do leite bovino utilizou-se 80 mL de leite desnatado e integral, adquiridos comercialmente da marca Piracanjuba® sob tratamento *Ultra High Temperature* (UHT). Ambos os volumes foram distribuídos em tubos falcon e levados à centrífuga por 45 minutos a 3700 rpm. A fase sobrenadante foi coletada e o precipitado descartado das duas amostras. Em seguida, usou-se duas concentrações de HCl ( $12 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) para ajustar o pH do sobrenadante a 4,6. Em seguida, as amostras foram aquecidas a  $40^\circ \text{C}$  e agitadas durante 30 minutos, e posteriormente, foram centrifugadas nas mesmas condições acima. Ao fim da centrifugação o sobrenadante (agora o whey isolado do leite integral e desnatado) foi coletado e armazenado em frasco âmbar. Finalmente, as amostras foram desidratadas utilizando um dessecador de alimentos na temperatura de  $60^\circ \text{C}$  por cerca de 48h (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama do isolamento do whey protein.

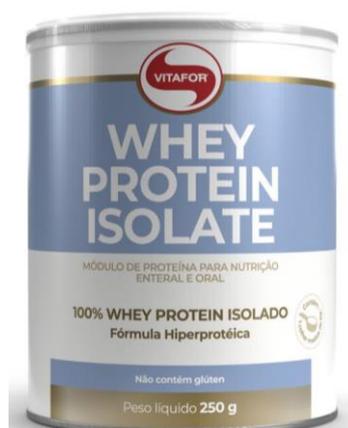


FONTE: Autoria própria. Usando o software BIORENDER (2022).

#### 4.1.1 Whey protein comercial

Os complexos foram sintetizados também utilizando o whey protein isolado adquirido comercialmente da Vitafor®, por apresentar um grau de pureza adequado às análises (Figura 6).

Figura 6 - Whey protein isolado da Vitafor®.

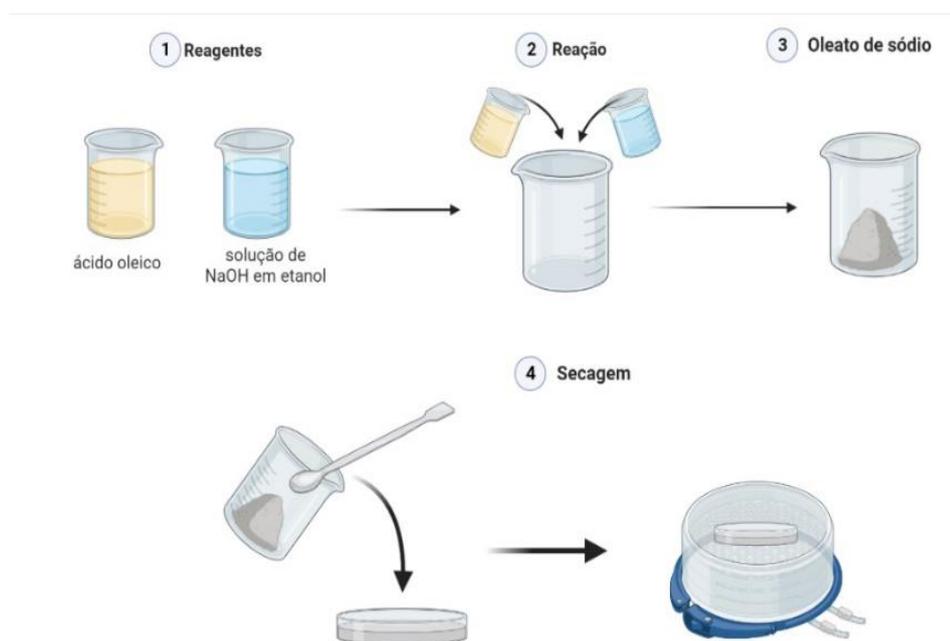


FONTE: Disponível em: <https://www.vitafor.com.br/whey-protein-isolate---250g---vitafor/p>.

## 4.2 Síntese do oleato de sódio

O oleato de sódio foi sintetizado a partir de uma reação de neutralização com 1,24 g de hidróxido e sódio (NaOH, solução etanólica) 10 mL de ácido oleico (AO) na proporção 1:1. Ambos os reagentes foram colocados em um béquer e misturados com um bastão de vidro. O oleato de sódio foi colocado em um papel filtro para absorver o etanol (Figura 7). Por fim, foi rotulado e armazenado em um dessecador em vácuo para evitar contato com umidade e ar até seu uso posterior.

Figura 7 - Diagrama da síntese do oleato de sódio.



FONTE: Autoria própria. Usando o software BIORENDER (2022).

### 4.3 Síntese do complexo whey-ácido oleico

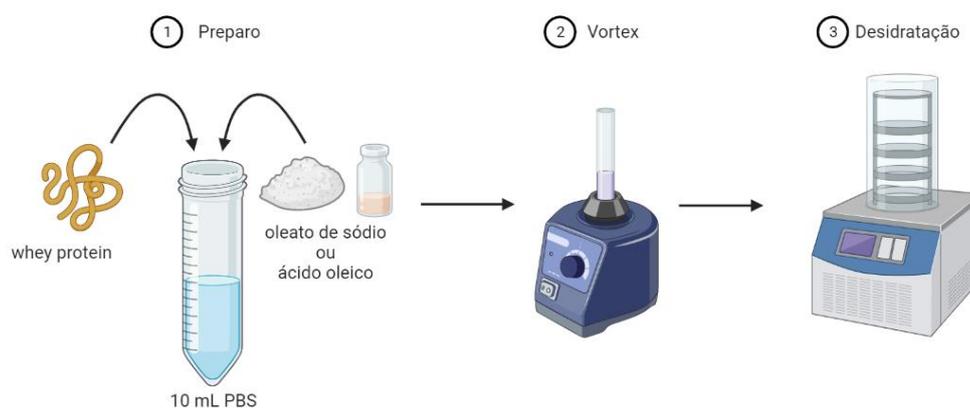
O complexo de whey protein com ácido oleico (AO) da Perfyl Tech (PM: 282,47, 100% puro) foi sintetizado utilizando-se 11  $\mu\text{L}$  de ácido oleico (3,5 mM) e 0,49 g de whey protein. Colocou-se em um tubo falcon contendo 10 mL de tampão fosfato-salino (ou PBS com pH = 7,18), o whey protein e o AO e levou-se ao vórtex por 10 minutos. Por fim, as amostras foram reservadas em frascos de penicilina e guardadas em um freezer. As amostras foram guardadas para serem caracterizadas quimicamente posteriormente (Figura 8).

### 4.4 Síntese do complexo whey-oleato de sódio

O complexo de whey protein com oleato de sódio foi sintetizado utilizando-se 0,0106 g de oleato de sódio (3,5 mM) e 0,49 g (700  $\mu\text{M}$ ) de whey protein. Esses reagentes foram

adicionados a um tubo falcon contendo 10 mL de tampão fosfato-salino (ou PBS com pH = 7,18). A mistura foi levada ao vórtex por 10 minutos. Finalmente, as misturas foram desidratadas utilizando um dessecador de alimentos a uma temperatura de 60° C por cerca de 26h. As amostras foram guardadas para serem caracterizadas quimicamente posteriormente (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama da síntese dos complexos de whey protein com ácido oleico ou oleato de sódio.



FONTE: Autoria própria. Usando o software BIORENDER (2022).

#### 4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR em modo de refletância total atenuada (ATR) das amostras foram registrados em um equipamento AGILENT CARY 630 na faixa de  $650\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ . O equipamento encontra-se disponível na UNIFESSPA (Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará) - Campus Marabá, no Laboratório de Análise Química. Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos por inserção de cada amostras diretamente no cristal do aparelho FTIR.

#### 4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Utilizou-se o cromatógrafo líquido da Shimadzu 20AT, contendo uma bomba SPDM20A, degaseificador da fase móvel DGU-20A5R, coluna Shim-pack VP-ODS C18 nas dimensões de 150 L x 4,6 e um detector de arranjo de diodos (DAD) no modo varredura de 195 a 780 nm, composto por uma lâmpada de tungstênio e de deutério (D2W). A fase móvel constitui-se por dois solventes, o primeiro como água deionizada (MicroQ 18,7  $\mu\text{S}$ ) acidificada com ácido acético 1% e o segundo como acetonitrila (grau de pureza HPLC,  $\geq 99,9\%$ ).

As análises foram realizadas no modo isocrático com 95% de acetonitrila por 30 minutos com 30  $\mu\text{L}$  de cada solução. A primeira solução analisada foi o ácido oleico 0,2 /mL com 1% de ácido acético, a segunda foi o complexo BAMLET desnatado diluído em metanol cuja concentração era de 0,106 mg/mL.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento dos whey protein e sínteses dos complexos

Ao expor as amostras de leite centrifugadas à pH 4.6 e a calor (ilustrado na Figura 5), precipitam-se a porção de caseínas presentes no leite. O sobrenadante (chamado de whey protein) é primariamente composto de ALA e  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 9) (BOYER, 2000; PETTERSSON; MOSSBERG; SVANBORG, 2006).

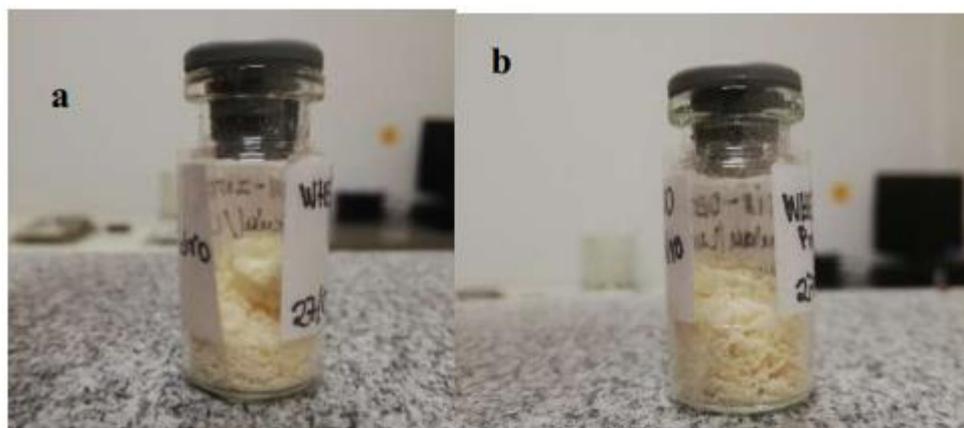
Figura 9 - Whey protein isolado. O líquido esverdeado é o sobrenadante que abriga a maior quantidade de ALA e o sólido precipitado é a porção de caseínas.



FONTE: Autoria própria (2022).

Visando melhores condições para o armazenamento e para diminuir as chances de proliferação de micro-organismos e avaliação de suas atividades microbiológicas e anticâncer e para complexação, as amostras de whey isolado foram desidratadas e obteve-se um pó amarelado (Figura 10).

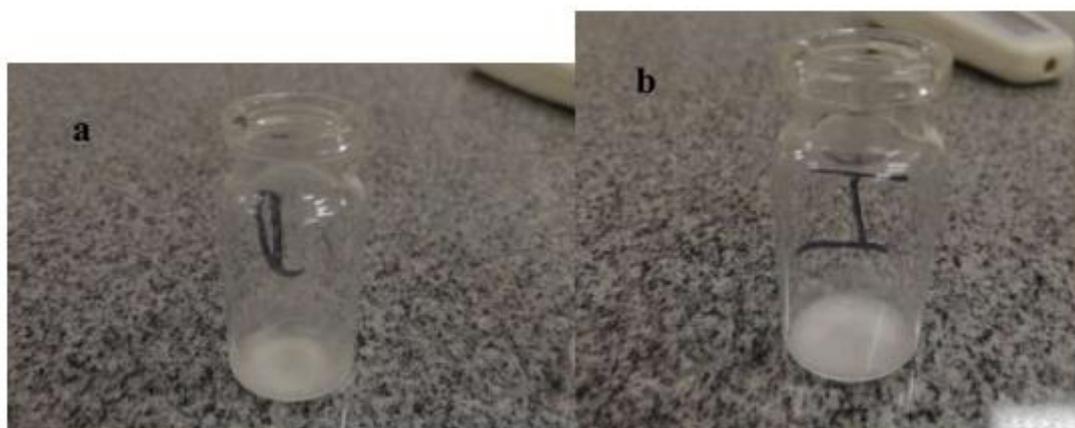
Figura 10 - Whey protein desidratado. *a* corresponde ao whey protein do leite desnatado e *b* do integral.



FONTE: Autoria própria (2022).

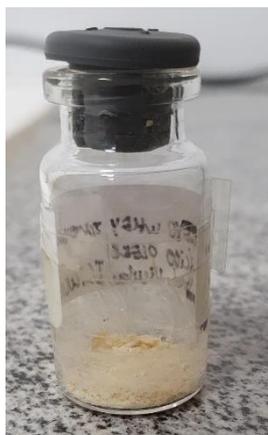
Esse whey em pó foi utilizado para sintetizar o complexo BAMLET (Figura 11). Apesar do método não descrever o preparo com ácido oleico (Figura 12), esta pesquisa decidiu padronizar as sínteses para todos os complexos tanto com o ácido oleico quanto para o oleato de sódio e para o whey comercial a fim de averiguar se todos mantêm sua estrutura apoptótica.

Figura 11 - Complexos com oleato de sódio. *a* corresponde BAMLET com leite desnatado e *b* com leite integral.



FONTE: Autoria própria (2022).

Figura 12 – Complexo com whey integral + ácido oleico.

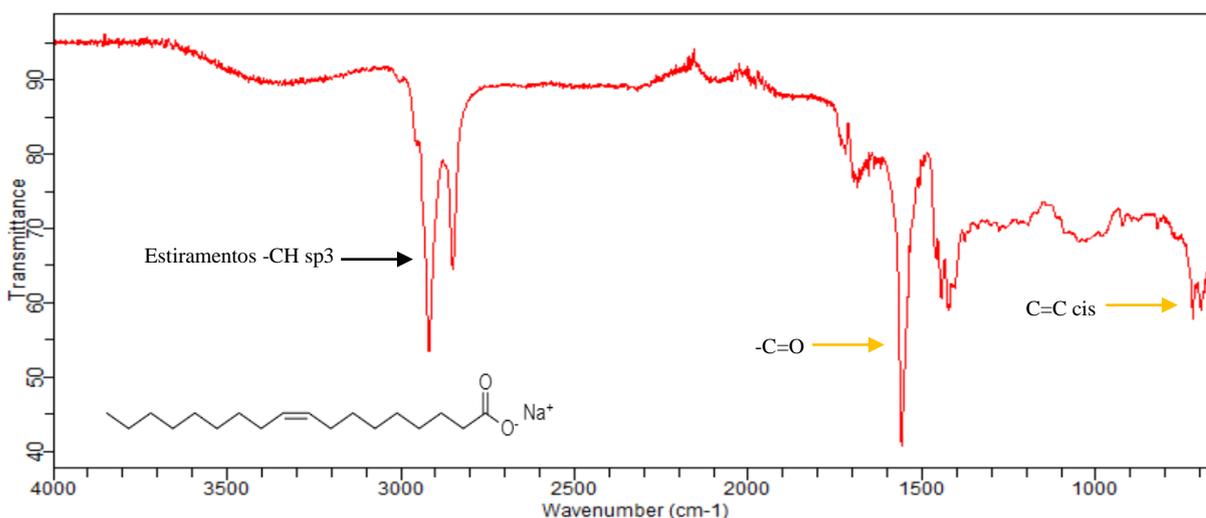


FONTE: Autoria própria (2022).

## 5.2 Análise por FTIR

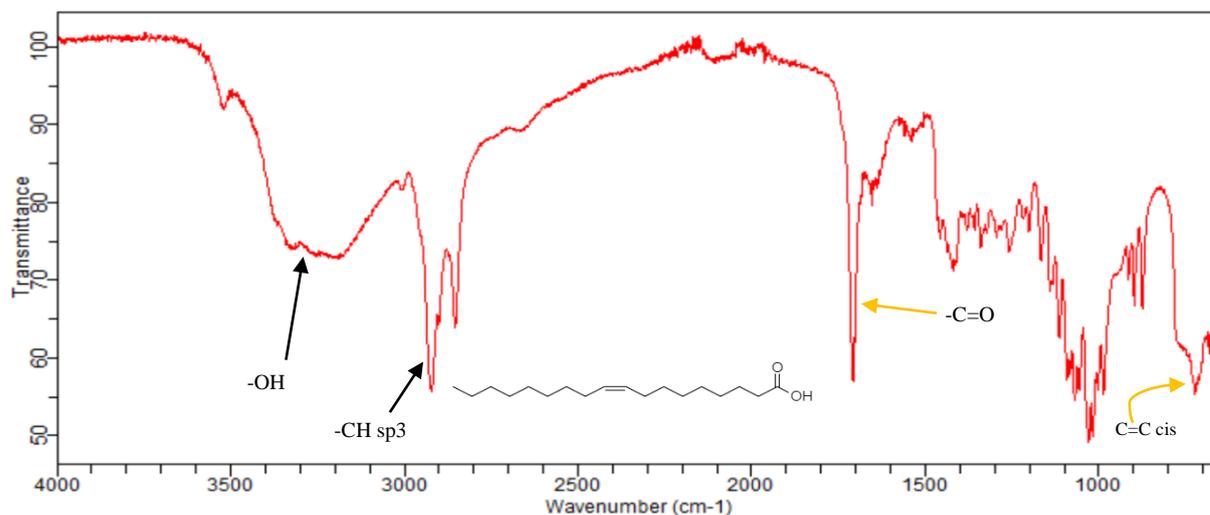
A caracterização do oleato de sódio está na Figura 13. O estiramento na faixa de  $2900\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{CH sp}^3$  (destacado pela seta preta) e o estiramento assimétrico forte em  $1550\text{ cm}^{-1}$  de  $\text{C}=\text{O}$  (destacado pela seta amarela) mostra que o produto fora sintetizado com sucesso. Quando comparado ao espectro do ácido oleico (Figura 14), nota-se o aparecimento da banda larga entre  $3200\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  (destacado pela seta preta), típico do estiramento  $-\text{OH}$ , o que confere com o esperado uma vez que o H fora substituído pelo íon  $\text{Na}^+$  na estrutura do ácido oleico.

Figura 13 - Espectro IV para o oleato de sódio.



FONTE: Autoria própria (2022).

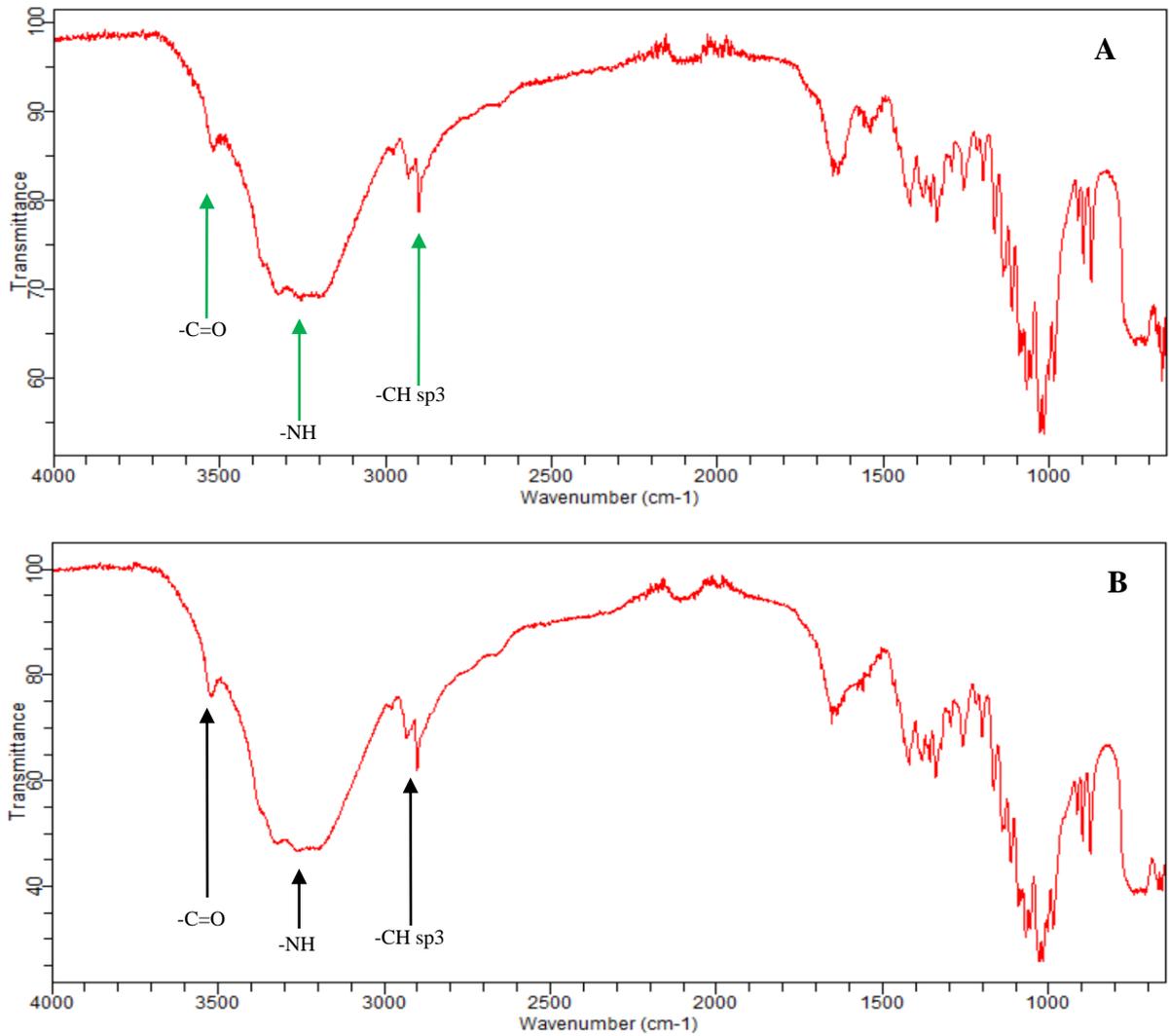
Figura 14 - Espectro IV para o ácido oleico.



FONTE: Autoria própria (2022).

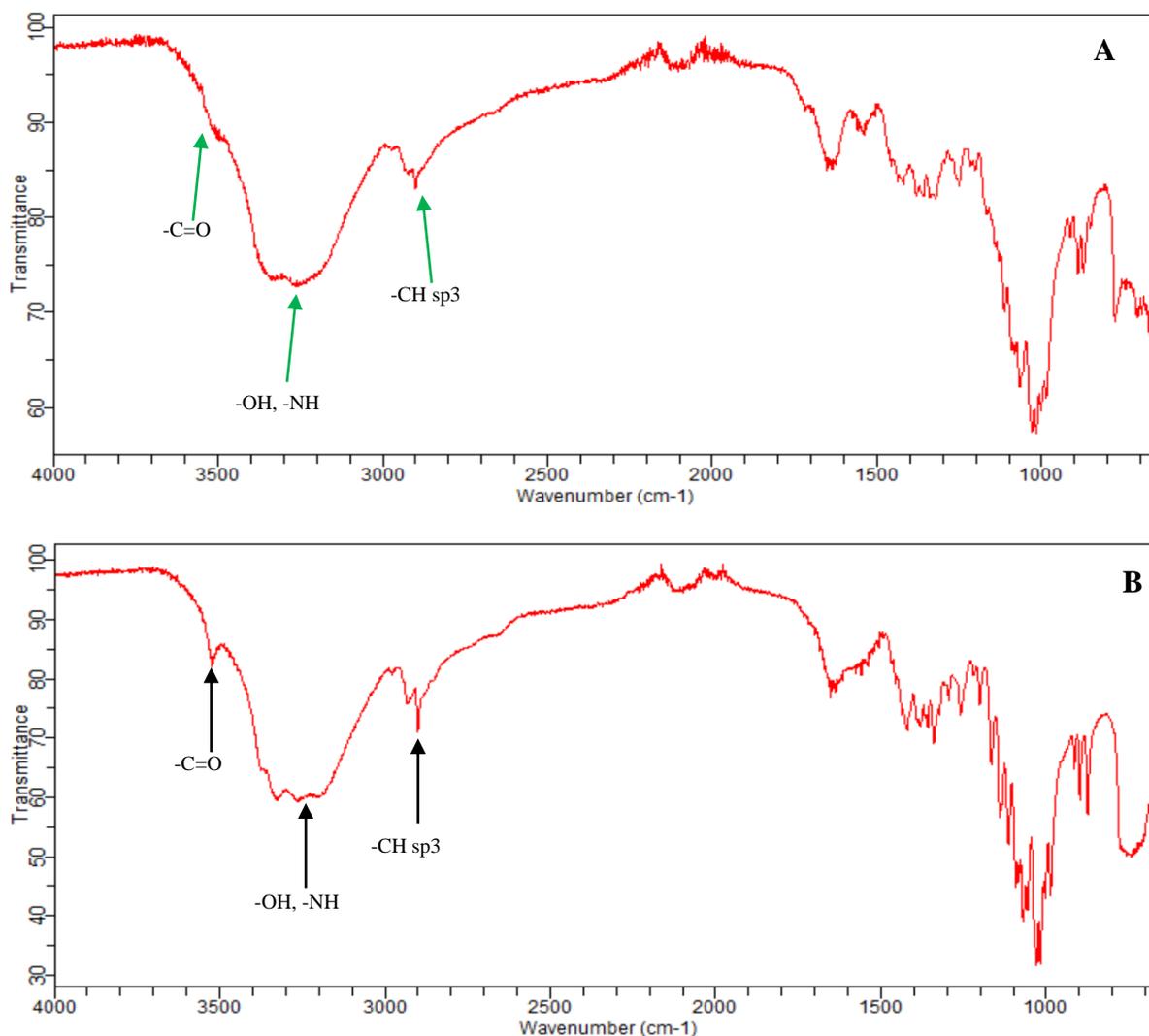
Já para as duas porções de whey protein (Figura 15A e 16A) não há diferenças significativas nas bandas de absorção referentes aos grupos funcionais, mas é possível notar uma diminuição nos estiramentos na faixa de 2850 a 2950 cm<sup>-1</sup> (setas verdes) e um quase desaparecimento da banda harmônica C=O em 3550 cm<sup>-1</sup> no whey desnatado (Figura 16A), corroborando com o processo de remoção ou diminuição do percentual de gordura, representado pelos lipídios. O mesmo fenômeno foi observado na caracterização dos complexos complexo whey integral-oleato de sódio e complexo whey desnatado-oleato de sódio (Figura 15B e Figura 16B).

Figura 15 – Espectros IV para *A* whey protein integral e *B* para o complexo BAMLET (whey integral + oleato de sódio).



FONTE: Autoria própria (2022).

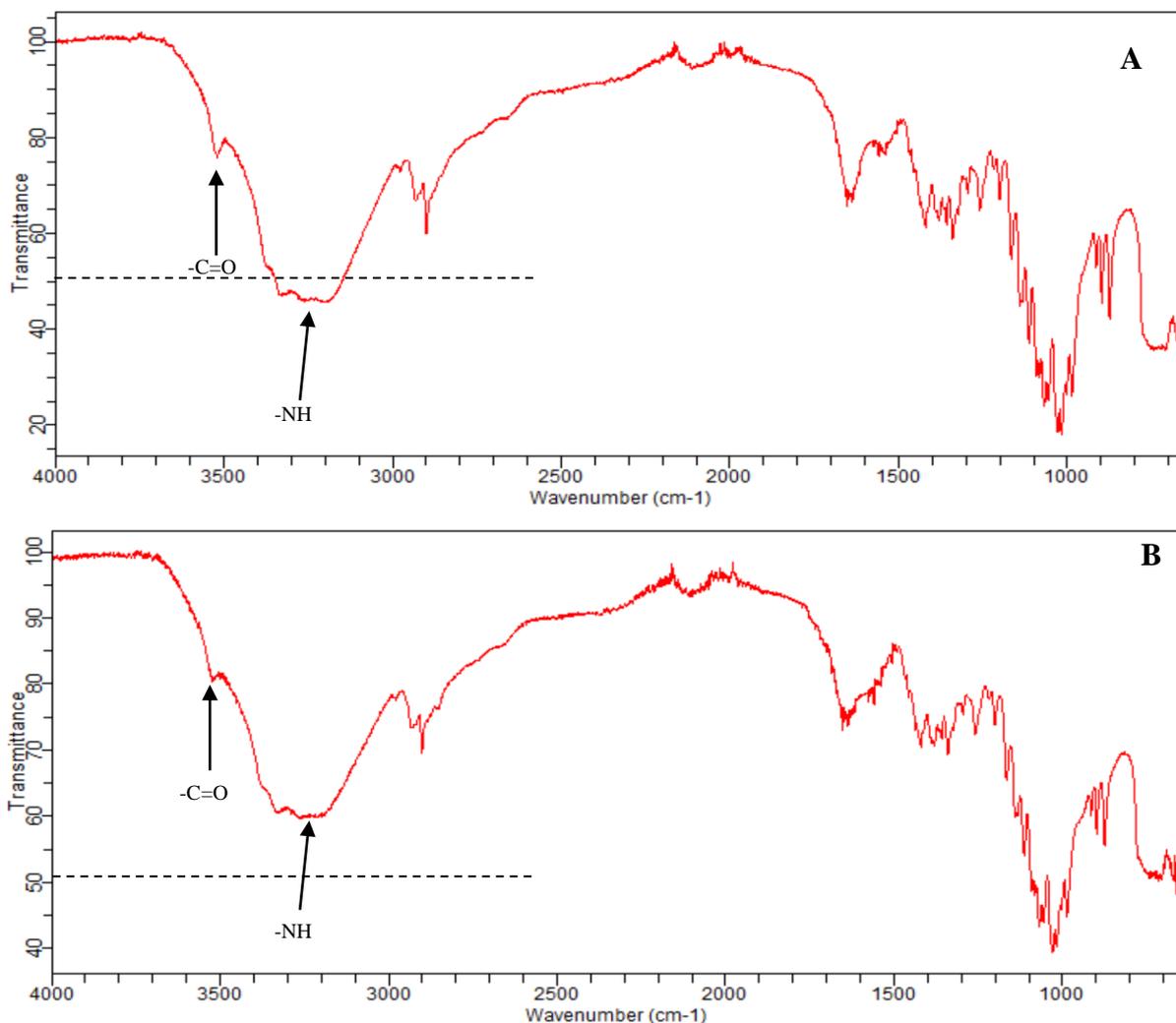
Figura 16 - Espectros IV para *A* o whey protein desnatado e *B* complexo BAMLET (whey desnatado + oleato de sódio).



FONTE: Autoria própria (2022).

O perfil de absorção dos grupos funcionais presentes nos complexos whey integral-oleato de sódio e whey integral-ácido oleico foi semelhante, porém houve uma leve diminuição na transmitância (destacado pelas linhas tracejadas) nos estiramentos -OH (o qual está sobreposto com a absorção N-H) entre 3000 – 3500 cm<sup>-1</sup> para os complexos com ácido oleico. A banda harmônica C=O em 3550 cm<sup>-1</sup> apresentou mais característico no espectro do whey integral-oleato de sódio (Figura 17).

Figura 17 - Espectro IV para *A* complexo BAMLET com ácido oleico e whey desnatado e *B* para o complexo BAMLET whey integral com ácido oleico.

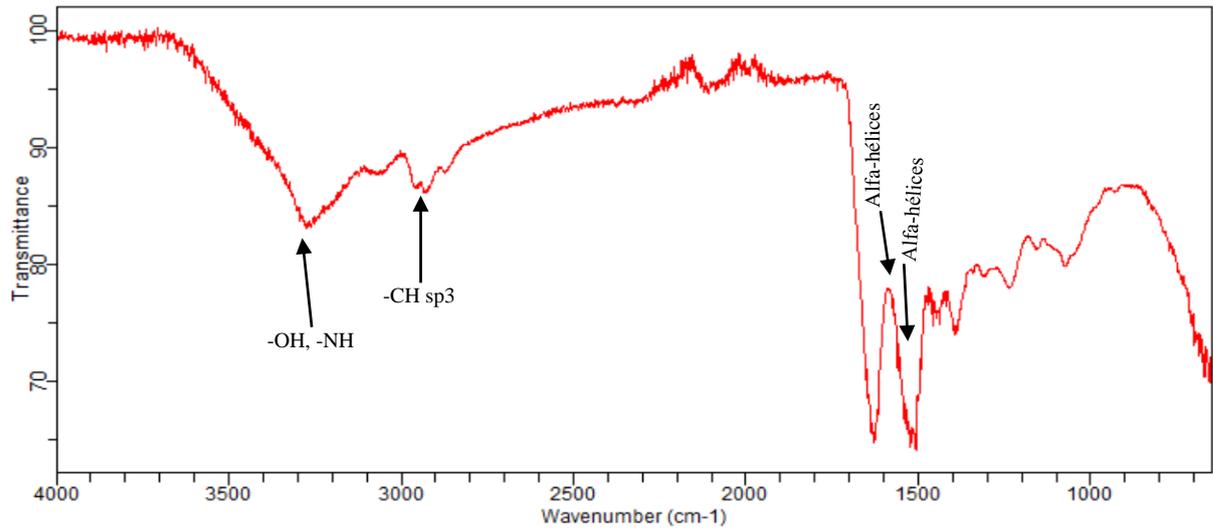


FONTE: Autoria própria (2022).

O perfil de absorção para o whey comercial da Vitafor® é substancialmente diferente quando comparado aos outros (Figura 18). Isto deve-se principalmente ao seu teor de pureza ser maior, ou seja, ele possui majoritariamente a ALA em sua composição, sem interferentes de outras substâncias como lipídios e outras proteínas presentes no whey bovino.

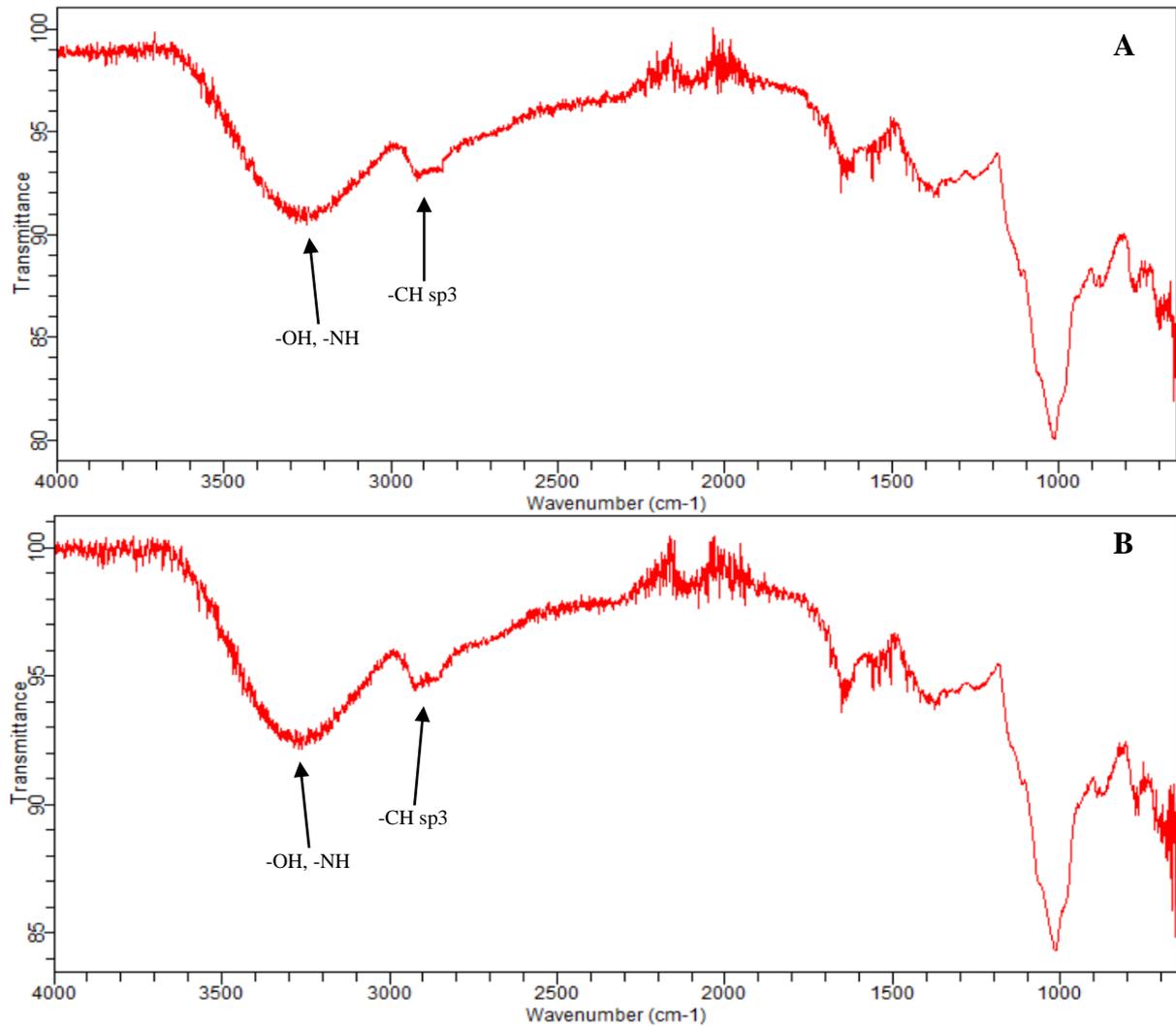
Fang e Dalgeish (1998) em seu estudo mostram que as bandas entre  $1649 - 1659 \text{ cm}^{-1}$  são das vibrações das alfa-hélices da estrutura da ALA. Isso leva a crer que os estiramentos do whey protein comercial (Figura 18) entre 1500 e 1600 são provenientes das vibrações das  $\alpha$ -hélices da ALA. Os complexos do whey comercial possuem também um perfil similar entre si, isso indica que os resíduos, ou cromóforos dos ácidos graxos estão invisíveis, o que aponta para um alto grau de complexação da ALA (Figura 19).

Figura 18 - Espectro IV para o whey protein comercial.



FONTE: Autoria própria (2023).

Figura 19 - Espectro IV para *A* whey comercial + ácido oleico e *B* para o whey comercial + oleato de sódio.

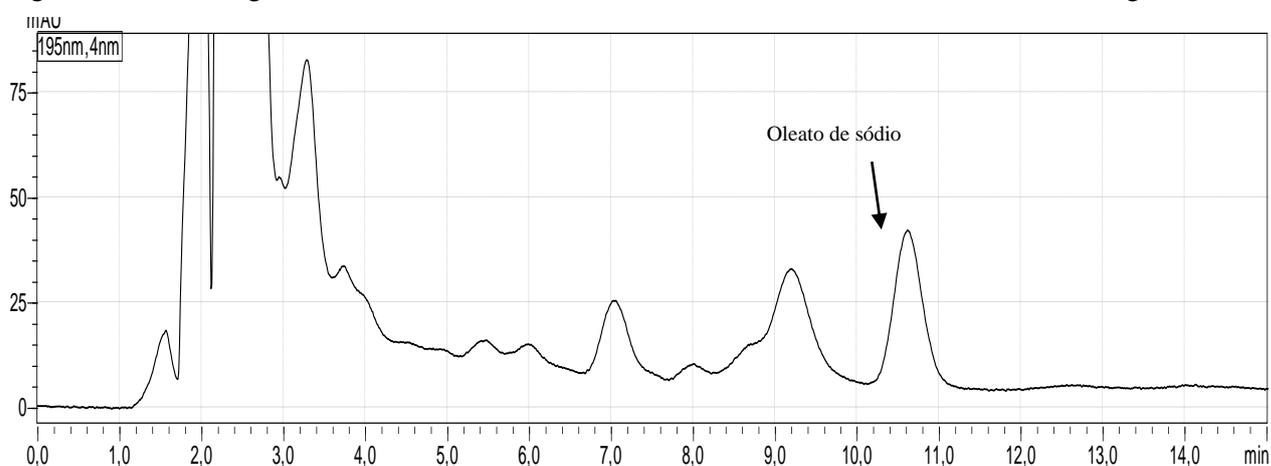


FONTE: Autoria própria (2023).

### 5.3 Análise por HPLC-DAD

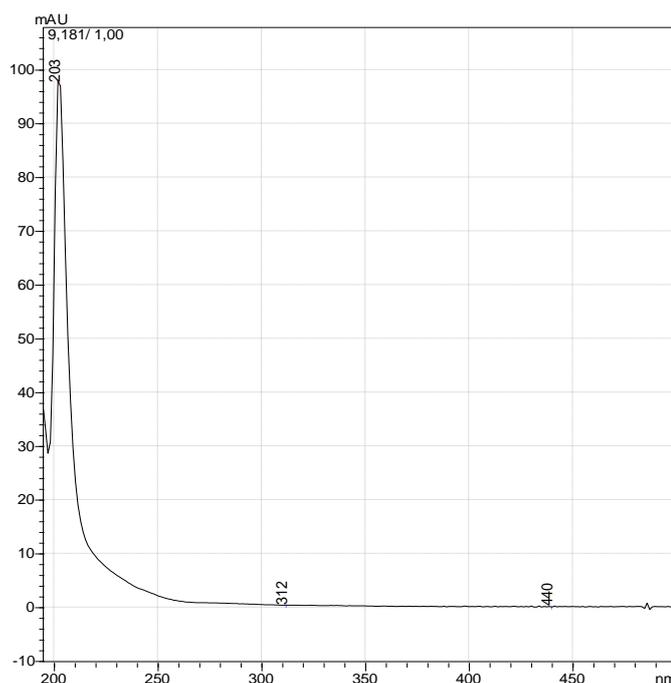
Os cromatogramas obtidos foram satisfatórios em caracterizar a presença de oleato de sódio. Segundo Bonfatti *et al.* (2008), as bandas de absorção no UV da ALA estariam entre 12 e 20 minutos. No cromatograma do complexo BAMLET (Figura 20), há presença de absorções em 9 minutos e 10 minutos e 50 segundos. Essas pequenas bandas devem-se a presença dos cromóforos do oleato de sódio, cuja absorção máxima está em 203 nm (Figura 21).

Figura 20 - Cromatograma do BAMLET desnatado com oleato de sódio em metanol a 0,106 mg/mL.



FONTE: Autoria própria (2023).

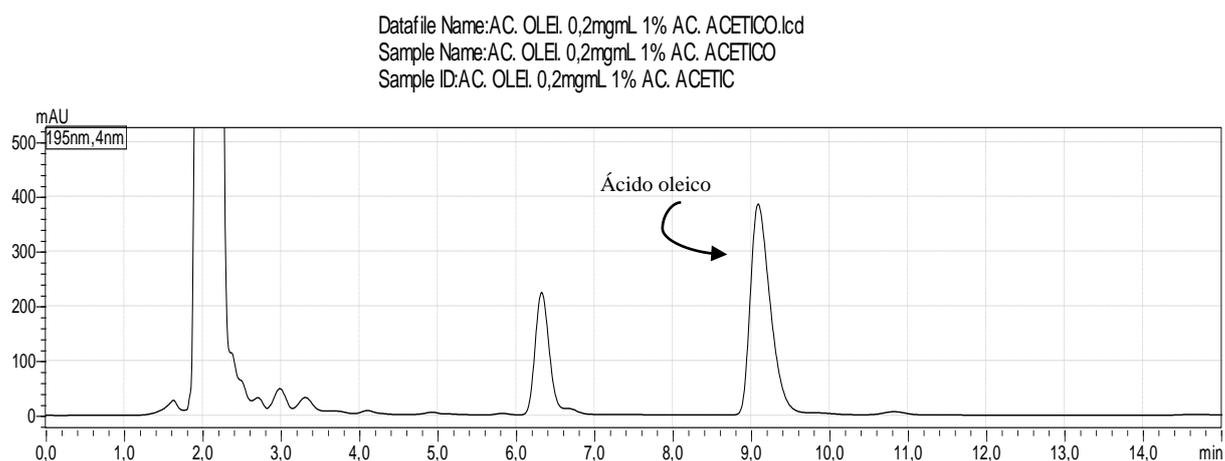
Figura 21 – Pico de absorção máxima da banda de absorção do oleato de sódio em 203 nm.



FONTE: Autoria própria (2023).

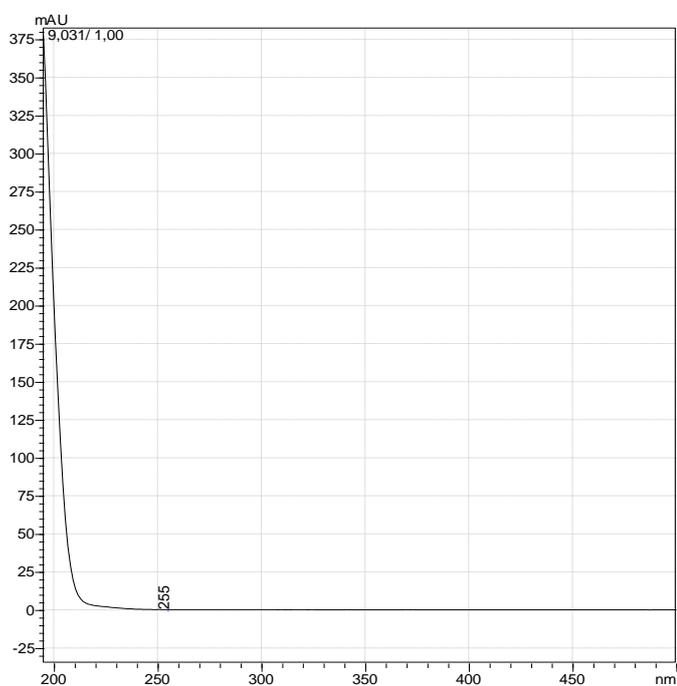
Analisando somente o ácido oleico, nota-se duas bandas de absorção nos minutos 6,5 e 9 no cromatograma da Figura 21 e sua absorção máxima em 195 nm (Figura 23). Ao sobrepor ambos os cromatogramas, observa-se que as bandas de absorção do oleato se coincidem com um leve afastamento no complexo devido ao efeito de interação com a proteína.

Figura 22 - Cromatograma do ácido oleico 0,2 mg/mL com um 1% de ácido acético.



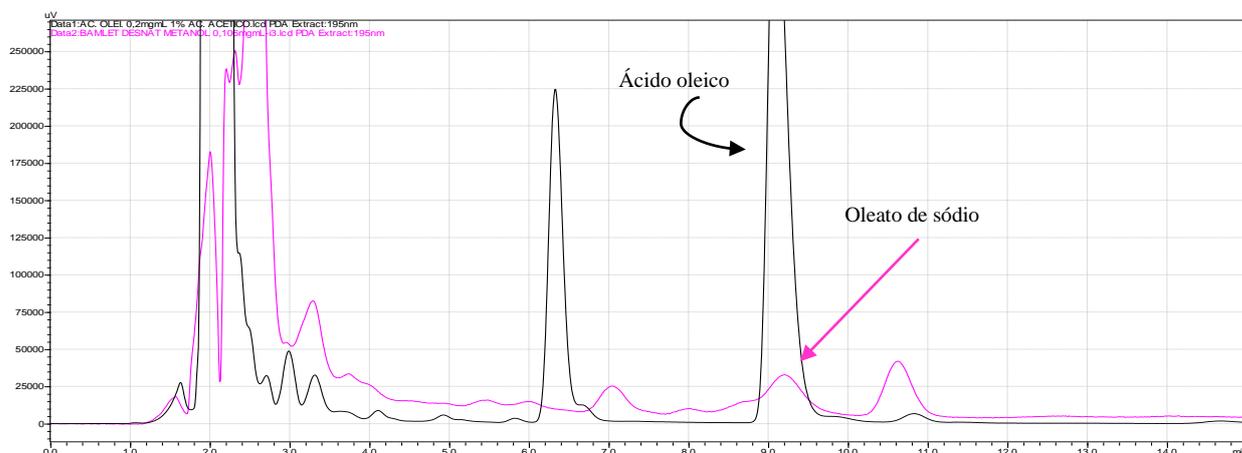
FONTE: Autoria própria (2023).

Figura 23 - Pico de absorção máxima da banda de absorção do ácido oleico em 195 nm.



FONTE: Autoria própria (2023).

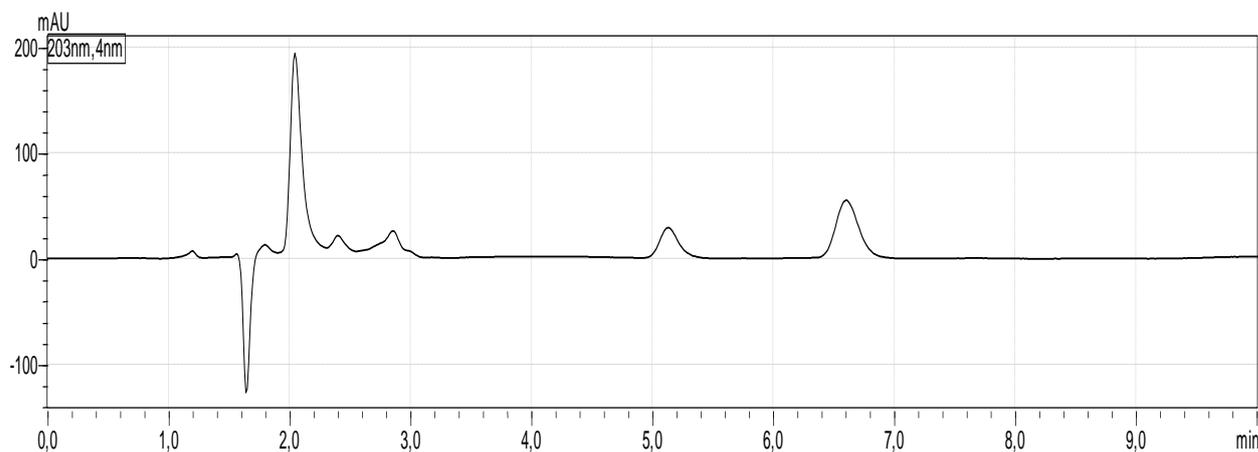
Figura 24 – Sobreposição dos cromatogramas *em rosa* do BAMLET desnatado em metanol a 0,106 mg/mL e *em preto* do ácido oleico a 0,2 mg/mL com ácido acético 1%.



FONTE: Autoria própria (2023).

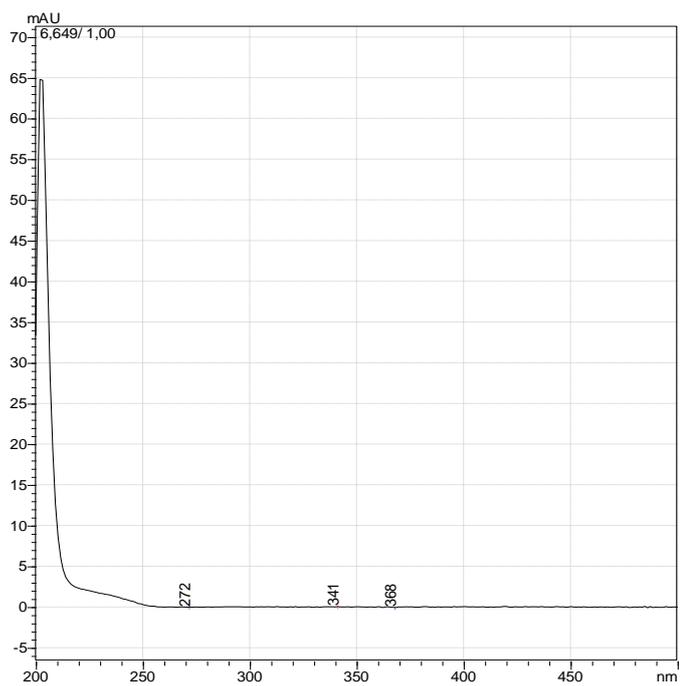
Partindo para uma análise somente com o oleato de sódio (Figura 25), mas em outra fase móvel que não interferirá na discussão pois ao analisarmos o pico de absorção no UV na Figura 26, observa-se que o pico de absorção é o mesmo do complexo (Figura 21) o que comprova a presença do oleato de sódio no complexo e sua detecção por HPLC-DAD.

Figura 25 - Cromatograma do oleato de sódio 0,106 mg/mL em metanol. Fase móvel HPLC: água/ácido acético/Metanol isocrático.



FONTE: Autoria própria (2023).

Figura 26 - Pico de absorção máxima da banda de absorção do oleato de sódio em 203 nm.



FONTE: Autoria própria (2023).

Os testes da atividade biológica não puderam ser completados a tempo para serem inseridos neste texto, mas frisa-se que estão em andamento e futuramente serão publicados.

## 6 CRONOGRAMA

### 2021/2022

<b>Atividades/Bimestre</b>	<b>Ago-Set/21</b>	<b>Out-Nov/21</b>	<b>Dez-Jan/22</b>	<b>Fev-Mar/22</b>	<b>Abr-Mai/22</b>	<b>Jun-Jul/22</b>
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X
Isolamento do whey protein de leite bovino		X				
Síntese do oleato de sódio		X	X	X		
Síntese dos complexos de whey protein do leite bovino com oleato de sódio e ácido oleico			X	X		
Caracterização química dos complexos formados				X	X	

### 2022/2023

<b>Atividades/Bimestre</b>	<b>Ago-Set/22</b>	<b>Out-Nov/22</b>	<b>Dez/22-Jan/23</b>	<b>Fev-Mar/23</b>	<b>Abr-Mai/23</b>	<b>Jun-Jul/23</b>
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X
Síntese dos complexos de whey protein comercial com oleato de sódio e ácido oleico		X		X		
Caracterização química dos complexos formados				X	X	

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho levou ao isolamento e caracterização do whey protein a partir do leite integral e desnatado, os quais contêm proteínas importantes para o desenvolvimento de complexos anticancerígenos. Além do isolamento dos whey protein realizados, a síntese do oleato de sódio foi realizada com êxito, além dos complexos BAMLET whey integral-oleato de sódio, whey desnatado-oleato de sódio, whey integral-ácido oleico e whey desnatado-ácido oleico.

Das técnicas empregadas para a caracterização química, o FTIR mostrou-se mais promissor em identificar a presença de ácido oleico e oleato de sódio, além de corroborar com achados similares na literatura científica. Em relação ao HPLC-DAD, esta técnica demonstrou baixa sensibilidade em caracterizar os cromóforos do oleato de sódio e ácido oleico. Esse motivo pode estar relacionado a baixa presença destes cromóforos livres (isto é, estarem fortemente ligados à ALA) ou devido a sua degradação pelo ambiente, contudo, conseguiu-se identificar a presença dos referidos cromóforos no complexo BAMLET desnatado, o que não foi possível no complexo com o whey comercial. Esta pesquisa somente realizou os testes com os dois complexos.

Comparadas a outras terapias em desenvolvimento, estes complexos oferecem vantagens únicas que as destacam como uma alternativa promissora para o tratamento e desenvolvimento de linhas de pesquisa para o combate ao câncer. Além disso, esta pesquisa debruçou-se em métodos mais simples e baratos de todas as suas sínteses, o que pode futuramente, ser explorado para a fabricação dos complexos caso comprovado sua atividade anticâncer por meio desta metodologia em larga escala.

## REFERÊNCIAS

BARBANA, C.; SÁNCHEZ, L.; PÉREZ, M. D. Bioactivity of  $\alpha$ -lactalbumin related to its interaction with fatty acids: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 783–794, set. 2011. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.481368>.

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, n. 1, p. 101–106, 27 jun. 2008. DOI 10.1016/j.chroma.2008.04.075. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308007930>. Acesso em: 18 abr. 2023.

BOYER, R. F. **Modern experimental biochemistry**. 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2000.

CAWThERN, K. M.; PERMYAKOV, E.; BERLINER, L. J. Membrane-bound states of  $\alpha$ -lactalbumin: Implications for the protein stability and conformation. **Protein Science**, v. 5, n. 7, p. 1394–1405, 1996. DOI 10.1002/pro.5560050718. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.5560050718>. Acesso em: 23 jul. 2023.

CHANDRA, N.; BREW, K.; ACHARYA, K. R. Structural Evidence for the Presence of a Secondary Calcium Binding Site in Human  $\alpha$ -Lactalbumin. **Biochemistry**, v. 37, n. 14, p. 4767–4772, 1 abr. 1998. DOI 10.1021/bi973000t. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi973000t>. Acesso em: 16 jul. 2023.

COPPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. In vivo regulation of lipolysis in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n. 2, p. 177–193, 1 fev. 1994. DOI 10.1016/S0022-2275(20)41207-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520412076>. Acesso em: 31 ago. 2023.

COSTANZI, S.; NEUMANN, S.; GERSHENGORN, M. C. Seven Transmembrane-spanning Receptors for Free Fatty Acids as Therapeutic Targets for Diabetes Mellitus: Pharmacological, Phylogenetic, and Drug Discovery Aspects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16269–16273, jun. 2008. DOI 10.1074/jbc.R800014200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820714298>. Acesso em: 13 dez. 2022.

DELGADO, Y.; MORALES-CRUZ, M.; FIGUEROA, C. M.; HERNÁNDEZ-ROMÁN, J.; HERNÁNDEZ, G.; GRIEBENOW, K. The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the  $\alpha$ -lactalbumin component. **FEBS Open Bio**, v. 5, n. 1, p. 397–404, 2015. DOI 10.1016/j.fob.2015.04.010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.fob.2015.04.010>. Acesso em: 13 dez. 2022.

FANG, Y.; DALGLEISH, D. G. The conformation of  $\alpha$ -lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 2, p. 121–126, 1 abr. 1998. DOI 10.1016/S0268-005X(98)00003-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X98000034>. Acesso em: 7 ago. 2023.

FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; MOSSBERG, A.-K.; GRONLI, J.; MORK, S.; BJERKVIK, R.; SVANBORG, C. Human  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET) Kills Human Glioblastoma Cells in Brain Xenografts by an Apoptosis-Like Mechanism and Prolongs Survival. **Cancer Research**, v. 64, n. 6, p. 2105–2112, 16 mar. 2004. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-03-2661. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2661>. Acesso em: 13 dez. 2022.

GILLIN, F. D.; REINER, D. S.; WANG, C. S. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4617, p. 1290–1292, 23 set. 1983. <https://doi.org/10.1126/science.6310751>.

HÅKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 8064–8068, 15 ago. 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8064>.

HO, J. C. S.; STORM, P.; RYDSTRÖM, A.; BOWEN, B.; ALSIN, F.; SULLIVAN, L.; AMBITE, I.; MOK, K. H.; NORTHEN, T.; SVANBORG, C. Lipids as Tumoricidal Components of Human  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET): UNIQUE AND SHARED EFFECTS ON SIGNALING AND DEATH\*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17460–17471, 14 jun. 2013. DOI 10.1074/jbc.M113.468405. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820458879>. Acesso em: 21 jul. 2023.

LIŠKOVÁ, K.; KELLY, A. L.; O'BRIEN, N.; BRODKORB, A. Effect of Denaturation of  $\alpha$ -Lactalbumin on the Formation of BAMLET (Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4421–4427, 14 abr. 2010. DOI 10.1021/jf903901j. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf903901j>. Acesso em: 13 dez. 2022.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 9, n. 2, p. 136–156, jun. 2004. .

NADEEM, A.; SVANBORG, C.; HO, C. S. **PREPARATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPLEXES**. Lund: [s. n.], 8 nov. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PERMYAKOV; BERLINER, L. J.  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 269–274, 19 maio 2000. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01546-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579300015465>. Acesso em: 12 dez. 2022.

PERMYAKOV; KNYAZEVA, E. L.; LEONTEVA, M. V.; FADEEV, R. S.; CHEKANOV, A. V.; ZHADAN, A. P.; HÅKANSSON, A. P.; AKATOV, V. S.; PERMYAKOV, E. A. A novel method for preparation of HAMLET-like protein complexes. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1495–1501, 1 set. 2011. DOI 10.1016/j.biochi.2011.05.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908411001453>. Acesso em: 21 jul. 2023.

PETTERSSON, J.; MOSSBERG, A.-K.; SVANBORG, C. alpha-Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 1, p. 260–270, 23 jun. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.081>.

PUTHIA, M.; STORM, P.; NADEEM, A.; HSIUNG, S.; SVANBORG, C. Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumour cells). **Gut**, v. 63, n. 1, seç. Colon, p. 131–142, 1 jan. 2014. DOI 10.1136/gutjnl-2012-303715. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/63/1/131>. Acesso em: 15 jul. 2023.

RAMMER, P.; GROTH-PEDERSEN, L.; KIRKEGAARD, T.; DAUGAARD, M.; RYTTER, A.; SZYNIAROWSKI, P.; HØYER-HANSEN, M.; POVLSSEN, L. K.; NYLANDSTED, J.; LARSEN, J. E.; JÄÄTTELÄ, M. BAMLET Activates a Lysosomal Cell Death Program in Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 24–32, 12 jan. 2010. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-09-0559. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0559>. Acesso em: 13 dez. 2022.

RATH, E. M.; CHENG, Y. Y.; PINESE, M.; SARUN, K. H.; HUDSON, A. L.; WEIR, C.; WANG, Y. D.; HÅKANSSON, A. P.; HOWELL, V. M.; LIU, G. J.; REID, G.; KNOTT, R. B.; DUFF, A. P.; CHURCH, W. B. BAMLET kills chemotherapy-resistant mesothelioma cells, holding oleic acid in an activated cytotoxic state. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0203003, 29 ago. 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0203003. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203003>. Acesso em: 16 abr. 2023.

RATH, E. M.; DUFF, A. P.; HÅKANSSON, A. P.; KNOTT, R. B.; CHURCH, W. B. Small-angle X-ray scattering of BAMLET at pH 12: A complex of  $\alpha$ -lactalbumin and oleic acid: Small-Angle X-Ray Scattering of BAMLET at pH 12. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 82, n. 7, p. 1400–1408, jul. 2014. DOI 10.1002/prot.24508. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.24508>. Acesso em: 23 jul. 2023.

SÉRAPHIN, B. Biochemistry of protein complexes. **Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics**. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. DOI 10.1002/047001153X.g303206. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/047001153X.g303206>. Acesso em: 13 dez. 2022.

SUN, H.; JENSSEN, H.; SUN, H.; JENSSEN, H. Milk Derived Peptides with Immune Stimulating Antiviral Properties. **Milk Protein**. [S. l.]: IntechOpen, 2012. DOI 10.5772/50158. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/38832>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SVANBORG, C.; AGERSTAM, H.; ARONSON, A.; BJERKVIG, R.; FISCHER, W.; GUSTAFSSON, L.; HALLGREN, O.; LELJONHUVUD, I.; LINSE, S.; MOSSBERG, A.; NILSSON, H.; PETTERSSON, J.; SVENSSON, M. HAMLET Kills Tumor Cells by an Apoptosis-Like Mechanism Cellular, Molecular, and Therapeutic Aspects. 2003. .

SVENSSON; FAST, J.; MOSSBERG, A.-K.; DÜRINGER, C.; GUSTAFSSON, L.; HALLGREN, O.; BROOKS, C. L.; BERLINER, L.; LINSE, S.; SVANBORG, C.  $\alpha$ -Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion

to HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells). **Protein Science**, v. 12, n. 12, p. 2794–2804, 2003. DOI 10.1110/ps.0231003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1110/ps.0231003>. Acesso em: 23 jul. 2023.

SVENSSON, M.; HÅKANSSON, A.; MOSSBERG, A.-K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. Conversion of  $\alpha$ -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4221–4226, 11 abr. 2000. DOI 10.1073/pnas.97.8.4221. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.97.8.4221>. Acesso em: 22 jul. 2023.

SVENSSON, M.; SABHARWAL, H.; HÅKANSSON, A.; MOSSBERG, A. K.; LIPNIUNAS, P.; LEFFLER, H.; SVANBORG, C.; LINSE, S. Molecular Characterization of  $\alpha$ -Lactalbumin Folding Variants That Induce Apoptosis in Tumor Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 10, p. 6388–6396, 5 mar. 1999. DOI 10.1074/jbc.274.10.6388. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819875993>. Acesso em: 22 jul. 2023.

TOLIN, S.; DE FRANCESCHI, G.; SPOLAORE, B.; FRARE, E.; CANTON, M.; POLVERINO DE LAURETO, P.; FONTANA, A. The oleic acid complexes of proteolytic fragments of  $\alpha$ -lactalbumin display apoptotic activity: Oleic acid complexes of  $\alpha$ -lactalbumin fragments. **FEBS Journal**, v. 277, n. 1, p. 163–173, jan. 2010. DOI 10.1111/j.1742-4658.2009.07466.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.07466.x>. Acesso em: 13 dez. 2022.

XIAO, Z.; MAK, A.; KOCH, K.; MOORE, R. B. A molecular complex of bovine milk protein and oleic acid selectively kills cancer cells in vitro and inhibits tumour growth in an orthotopic rat bladder tumour model. **BJU International**, v. 112, n. 2, p. E201–E210, 2013. DOI 10.1111/j.1464-410X.2012.11737.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1464-410X.2012.11737.x>. Acesso em: 13 dez. 2022.