

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONARDO FERREIRA MEDEIROS

**PARTÍCULAS BIOINORGÂNICAS METAL-PROTEÍNA, COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA, INCORPORADAS EM FILMES DE
CASEÍNA PARA APLICAÇÃO EM DOENÇAS DE PELE CANINA**

Porto Alegre
Fevereiro de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LEONARDO FERREIRA MEDEIROS

**PARTÍCULAS BIOINORGÂNICAS METAL-PROTEÍNA, COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA, INCORPORADAS EM FILMES DE
CASEÍNA PARA APLICAÇÃO EM DOENÇAS DE PELE CANINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química.

Profa. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues

Porto Alegre
Fevereiro de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Leonardo Ferreira

Partículas bioinorgânicas metal-proteína, com ação antimicrobiana, incorporadas em filmes de caseína para aplicação em doenças de pele canina / Leonardo Ferreira Medeiros. -- 2024.

155 f.

Orientadora: Roberta da Silva Bussamara Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Ferro. 2. Zinco. 3. Albumina. 4. Caseína. 5. Atividade antimicrobiana. I. Rodrigues, Roberta da Silva Bussamara, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre fevereiro/2022 e fevereiro/2024, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Roberta da Silva Bussamara Rodrigues. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Luiza Abrahão Frank

Prof. Dr. Leandra Franciscato
Campo

Prof. Dr. Tales da Silva Daitx

Profa. Dra. Roberta Bussamara
Rodrigues

Leonardo Ferreira Medeiros

Dedico este trabalho a minha mãe, minha tia, minha avó e meu namorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a vida, que há me dado tanto.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Instituto de Química e ao Programa de pós-Graduação em Química pela acolhida e pelo conhecimento fornecido. A CAPES pelo fomento à pesquisa e a bolsa fornecida.

A minha orientadora, pela orientação e paciência, mas principalmente pelo carinho, amizade e amor com que trata teus alunos. És luz no nosso caminho e que haja sempre luz no teu caminhar.

Aos meus colegas do LaProMAQ, em especial a Louise, Kimberly e Camila, obrigado pela parceria, pelas conversas, fofocas e risadas. À Camila, agradeço a parceria desde a prova do mestrado (apesar de me incomodar tanto, todos os dias), passando por todos os perrengues juntos e agora terminando mais uma etapa. Que venha o doutorado!

Aos amigos Alexsandro, Camila, Lilian e Rodrigo, obrigado por fazerem parte da minha vida. O caminho foi mais brando ao lado de vocês. Os cafés e reuniões pós almoço foram bálsamo para a caminhada.

Àqueles que depositaram um pouco do seu tempo para que esse trabalho fosse produzido. Obrigado, Samanta do DLS, Vinícius do AFM e Lilian pelas liofilizações e agitadores.

Agradecimento especial a Louise e professora Franciele do LaBacVet, pelo auxílio para com os ensaios antimicrobianos.

Obrigado a minha família pelo amor, pelo carinho, pelo incentivo a nunca desistir de estudar e pela compreensão da minha ausência em alguns momentos. Foi por um bom motivo. Vocês terão o primeiro mestre da família.

Por fim, um agradecimento mais do que especial ao meu namorado. Você é meu porto seguro, meu farol e minha fortaleza. Obrigado por estar comigo em todos os momentos felizes e em outros nem tanto. Obrigado por me apoiar e incentivar sempre. Tua felicidade é a minha. Te amo, Gabriel.

Sonhos existem para serem realizados. Desistir não é uma opção.

"A minha vida é um vendaval que se soltou.
É uma onda que se levantou.
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
- Sei que não vou por aí!"

(Cântico Negro de José Régio, na voz de
Bethânia)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo central a produção de partículas modificadas pela conjugação de metais com as proteínas albumina e caseína, visando sua aplicação contra as bactérias patogênicas, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecalis*, causadoras de feridas de pele. As partículas foram sintetizadas pela adição de precursor de ferro e zinco às proteínas e o sistema foi mantido sob forte agitação por 24 h a temperatura ambiente. As partículas foram caracterizadas por meio de espectroscopia de fluorescência, infravermelho, análise de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e microscopia de força atômica. E sua atividade antimicrobiana foi testada frente as bactérias acima citadas. As análises de infravermelho e fluorescência indicaram alterações conformacionais nas proteínas e interações específicas entre proteína e metal, influenciadas pelo pH e concentração do precursor metálico. As partículas de zinco modificadas com ambas proteínas exibiram efeito antibacteriano (100%) em concentrações baixas (a partir de 5mM) contra *S. pseudintermedius*, em 24 h de contato. Para *E. faecalis*, foi observada uma atividade antimicrobiana de 99% para concentrações maiores que 50 mM e 150 mM para partículas com caseína e albumina, respectivamente. Com relação às partículas de ferro modificadas, verificou-se atividade contra *S. pseudintermedius* acima de 99% para concentrações acima de 50mM para partículas com albumina. Bem como, uma atividade acima de 90% para concentrações maiores que 400 mM, quando com caseína. [REDACTED]

[REDACTED]. Destaca-se o alcance dos objetivos propostos, a síntese de materiais inovadores com possibilidade de uso para tratamento de doenças de pele.

Palavras-chave: ferro, zinco, caseína, albumina, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

This study aimed at the central production of particles modified by the conjugation of metals with the proteins albumin and casein, with the purpose of their application against pathogenic bacteria, *Staphylococcus pseudintermedius*, and *Enterococcus faecalis*, which cause skin wounds. The particles were synthesized by adding iron and zinc precursors to the proteins, and the system was kept under strong agitation for 24 hours at room temperature. The particles were characterized using fluorescence spectroscopy, infrared analysis, hydrodynamic diameter analysis, zeta potential, and atomic force microscopy. Their antimicrobial activity was tested against the mentioned bacteria. Infrared and fluorescence analyses indicated conformational changes in the proteins and specific interactions between protein and metal, influenced by pH and metal precursor concentration. Zinc particles modified with both proteins exhibited antibacterial effects (100%) at low concentrations (starting from 5mM) against *S. pseudintermedius* within 24 hours of contact. For *E. faecalis*, antimicrobial activity of 99% was observed for concentrations higher than 50mM and 150mM for particles with casein and albumin, respectively. Regarding modified iron particles, activity against *S. pseudintermedius* was above 99% for concentrations above 50mM for particles with albumin. Additionally, an activity above 90% was observed for concentrations higher than 400 mM when using casein. Subsequently, casein films containing the modified zinc particles were synthesized. The modified films showed a high water absorption rate and antimicrobial efficacy (92%) against *S. pseudintermedius* in 48 hours for films containing particles modified with 150mM of zinc at pH 7.0. The achievement of the proposed objectives is noteworthy, involving the synthesis of innovative materials with the potential for use in the treatment of skin diseases.

Keywords: iron, zinc, casein, albumin, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele canina.

Figura 2. (A) Dermatite facial em Bulldog Inglês. (B) Pápulas eritematosas, pústulas e colarinhos epidérmicos em um cachorro com foliculite bacteriana.

Figura 3. Pioderma em um Pastor Alemão com ulceração, secreção purulenta e formação de crostas na virilha.

Figura 4. Recorrência de diferentes espécies de bactérias *Staphylococcus* spp em 9 animais estudados.

Figura 5. Infecção por *Staphylococcus pseudintermedius*, no 11º dia pós-operatório. Fotografia externa do paciente no 11º dia pós-operatório, demonstrando crostas amarelas ao longo da pálpebra inferior esquerda e couro cabeludo; e leve eritema, edema e induração.

Figura 6. As proporções e os intervalos de confiança de 95% de cada antibiótico comparados entre 2010 e 2021 para amoxicilina/clavulanato (AMC), cloranfenicol (C), gentamicina (CN), cefpodoxima (CPD), clindamicina (DA), eritromicina (E), cefoxitina (FOX), cefalotina (KF), marbofloxacina (MAR), oxacilina (OX), penicilina (P), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) e tetraciclina (TE).

Figura 7. Rotas para obtenção de nanopartículas.

Figura 8. Fórmula estrutural da β -caseína (A), κ -caseína (B) e α -caseína (C).

Figura 9. Modelo de nanocluster para micelas de caseína (estruturas filamentosas) e nanoclusters de fosfato de cálcio (círculos escuros).

Figura 10. Estrutura quaternária da ovalbumina.

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de géis de clara de ovo em diferentes pH. (a) pH 5,0; (b) pH 7,0 e; (c) pH 9,0.

Figura 12. Esquema reacional da obtenção de partículas.

Figura 13. Imagens das amostras contendo o precursor metálico de ferro sem a adição de proteínas e com pH ajustado em 9.

Figura 14. Imagens das amostras contendo o precursor metálico de zinco sem a adição de proteínas e com pH ajustado em 7.

Figura 15. Imagens das amostras contendo a proteína, sem a adição de metais, sem ajuste de pH e em pH ajustado em 2, 7 ou 9.

Figura 16. Imagens das amostras de albumina e caseína com ferro, com e sem ajuste de pH.

Figura 17. Imagens das amostras de albumina e caseína com zinco, com e sem ajuste de pH.

Figura 18. Hipóteses de mudanças conformacionais da albumina em diferentes pH. Uma unidade de proteína é representada por cada conjunto verde/laranja. As setas ao lado do percentual indicam a variação em relação à proteína em pH 10.

Figura 19. Hipóteses de mudanças estruturais das micelas de caseína em diferentes valores de pH.

Figura 20. Hipótese de interação dos íons ferro com albumina, na síntese sem ajuste de pH.

Figura 21. Hipótese de interação dos íons ferro com albumina na síntese sem ajuste de pH, quando do aumento observado no tamanho de partícula devido a hidratação destes íons.

Figura 22. Suposição da hidratação do hidróxido de ferro formado em pH alcalino.

Figura 23. Hipótese de interação dos íons ferro com caseína na síntese sem ajuste de pH, quando da diminuição do tamanho observado devido a dissociação micelar e internalização dos íons metálicos.

Figura 24. Hipótese 2 de conformação da caseína quando adicionado metal.

Figura 25. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e ferro nas concentrações de 0 a 300 mM, sem ajuste do pH.

Figura 26. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e ferro nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH.

Figura 27. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e zinco nas concentrações de 0 a 75 mM, sem ajuste do pH.

Figura 28. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e zinco nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH em 7.

Figura 29. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e ferro nas concentrações de 0 a 150 mM, sem ajuste do pH.

Figura 30. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e ferro nas concentrações de 0 a 700 mM, com ajuste do pH em 9.

Figura 31. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e zinco nas concentrações de 0 a 50mM, sem ajuste do pH.

Figura 32. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e zinco nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH em 7.

Figura 33. Estrutura quaternária da ovalbumina evidenciando os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura: triptofano (●), fenilalanina (●) e tirosina (●).

Figura 34. Espectro de fluorescência para soluções contendo 2% de albumina (A) e caseína (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Figura 35. Espectro de fluorescência para as soluções contendo as partículas formadas com 2% de albumina e 50 mM de FeCl_3 (A) e 2% de caseína e 50 mM de FeCl_3 (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Figura 36. Espectro de fluorescência para as soluções contendo as partículas formadas com 2% de albumina e 50 mM de ZnCl_2 (A) e 2% de caseína e ZnCl_2 (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Figura 37. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de albumina, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de ferro adicionado na síntese das partículas sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 9 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Figura 38. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de caseína, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de ferro adicionado na síntese das partículas sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 9 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Figura 39. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência da albumina, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de zinco adicionado, sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 7 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Figura 40. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de caseína, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de zinco adicionado, sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 7 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Figura 41. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da albumina pelo ferro com ajuste de pH igual 9 e em comprimento de onda excitação de 280 nm e 295 nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

Figura 42. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da caseína pelo ferro sem ajuste de pH e em comprimento de onda excitação de 280 nm e 295 nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

Figura 43. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da caseína pelo ferro com ajuste de pH igual a 9 e em comprimento de onda excitação de 280nm e 295nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

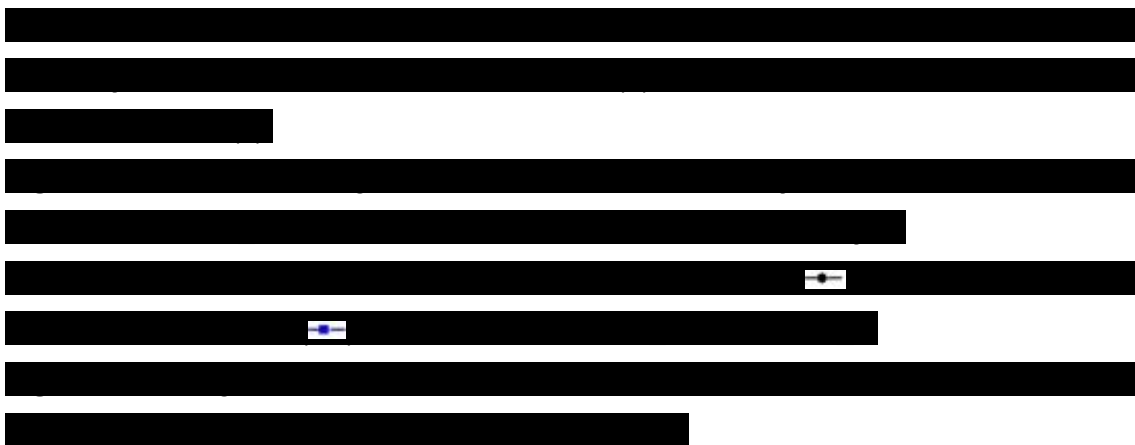
Figura 44. Exemplo de desvio da linearidade observado em amostras onde ocorrem simultaneamente supressões dinâmicas e estáticas.

Figura 45. Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{Fe}]$ para a albumina e o ferro em pH 9, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

Figura 46. Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{Fe}]$ para a caseína e o ferro sem ajuste de pH, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

Figura 47. Gráficos de $\log [(F_0-F)/F]$ vs $\log [Fe]$ para a caseína e o ferro em pH 9, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

Figura 48. Diferença estrutural entre bactérias gram negativas e gram positivas.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais das moléculas de caseína.

Tabela 2. Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta da proteína albumina em diferentes pH.

Tabela 3. Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta da proteína caseína em diferentes pH.

Tabela 4. A. Diâmetro hidrodinâmico das partículas e distribuição, pH, Span e potencial zeta das soluções de FeCl_3 , sem as proteínas, em pH 9*.

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico das partículas e distribuição, pH, Span e potencial zeta das soluções de ZnCl_2 , sem as proteínas, em pH 7*.

Tabela 6. Tamanhos de partículas, pH, Pdl e potencial zeta das amostras de albumina com metal ferro, sem e com ajuste de pH.

Tabela 7. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de albumina com metal zinco, sem e com ajuste de pH.

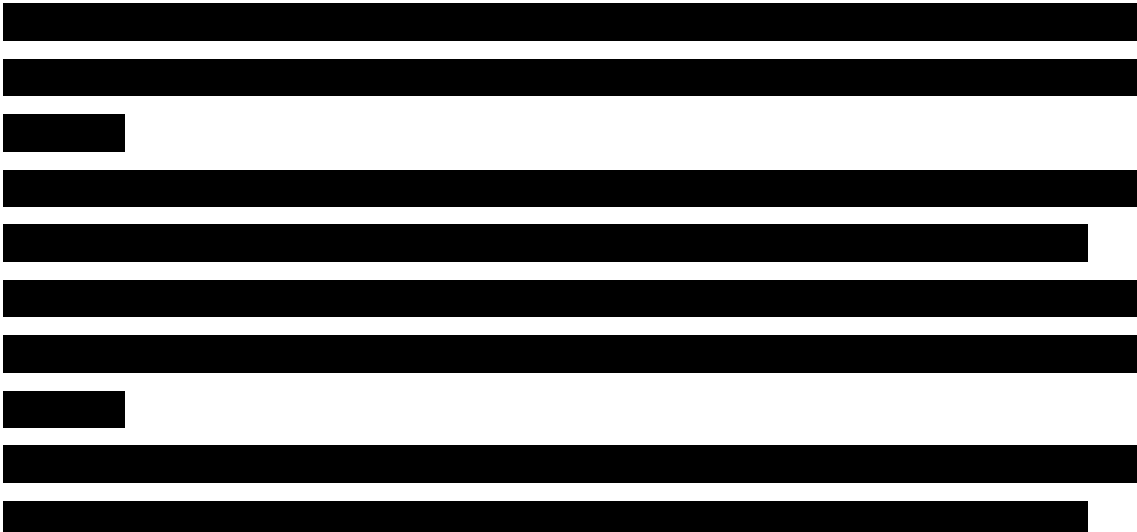
Tabela 8. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de caseína com metal ferro, sem e com ajuste de pH.

Tabela 9. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de caseína com metal zinco, sem e com ajuste de pH.

Tabela 10. Resultados referentes as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e contante bimolecular de supressão (K_q).

Tabela 11. Comparação de constantes bimoleculares de supressão para diferentes compostos frente ao triptofano.

Tabela 12. Constantes de ligação e número de sítios de ligação para as amostras analisadas.



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	45
3.1. DOENÇAS DE PELE EM ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	45
3.2. BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS DE PELE EM CÃES	47
3.2.1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	47
3.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	49
3.3. TRATAMENTOS	50
3.4. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E ÓXIDO METÁLICAS	52
3.5. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	54
3.5.1. Sínteses verdes	56
3.5.2. Proteínas como <i>templates</i>	57
4. METODOLOGIA	65
4.1. REAGENTES.....	65
4.2. SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE ZINCO E DE FERRO USANDO COMO BIOTEMPLATES AS PROTEÍNAS CASEÍNA E ALBUMINA.....	65
4.3. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E DO POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS.....	66
4.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR).....	67
4.5. ANÁLISE DA INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	67
4.6. [REDACTED]	69
4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.	70
4.7.1. Taxa de absorção de água.....	70
4.7.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)	70

4.8. ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6.1. OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	72
6.2. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E DO POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS.....	78
6.3. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR.....	99
6.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA POR FLUORESCÊNCIA.....	110
6.4.1. Espectros de Fluorescência.....	110
6.4.2. Análise da supressão de fluorescência devido a interação metal-proteína	
120	
6.4.3. Estudo de interação entre metal-proteína através da constante de ligação (K_b) e pelo número de sítios ligantes (n).....	128
6.5. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTÍCULAS FORMADAS	
131	
6.6. OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES INCORPORADOS SUPERFICIALMENTE COM PARTÍCULAS CASEÍNA-ZINCO.....	139
7. CONCLUSÃO.....	147
BIBLIOGRAFIA.....	147
APÊNDICE A - Espectros de fluorescência.....	162
APÊNDICE B - Dados de intensidade de fluorescência.....	169

1. INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo canino, composta por epiderme e derme, desempenha funções cruciais na proteção e regulação do organismo. Essas camadas formam uma complexa estrutura responsável por funções vitais em humanos e animais. Diversos fatores, como alergias, parasitas e predisposição genética, podem contribuir para doenças de pele em cães, destacando-se infecções bacterianas, como o pioderma. A barreira cutânea comprometida facilita a invasão bacteriana, resultando em infecções, sendo *Staphylococcus pseudintermedius* a causa mais comum. A *Staphylococcus pseudintermedius*, a principal bactéria causadora de piodermite canina, é prevalente em infecções auriculares e de feridas, complicando casos dermatológicos e urinários. Sua presença comum na flora canina pode causar infecção em situações de resistência diminuída do hospedeiro ou alteração na barreira cutânea. Além dos efeitos em cães, destaca-se como uma zoonose preocupante, sendo encontrada em complicações de pele humana e associada a casos moderados, como endocardite. Simultaneamente, *Enterococcus faecalis*, comensal gastrointestinal em mamíferos, é uma causa frequente de bacteriúria em cães e pode causar infecções cutâneas em humanos, alertando para o risco de zoonose devido à sua prevalência em animais domésticos.

O tratamento convencional para doenças causadas por bactérias como *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecalis* envolve principalmente antibióticos, inicialmente aplicados topicamente para evitar resistência. Contudo, o uso extensivo de antibióticos resultou em resistência, especialmente com relação à *S. pseudintermedius*. A *E. faecalis* também demonstra resistência, destacando a necessidade de tratamentos alternativos. Pesquisas exploram novos métodos para tratamentos de doenças de pele como utilização de extratos de plantas e nanomateriais, sendo as nanopartículas metálicas (NPs) (prata, cobre, titânio, ferro, zinco) foco de estudos devido à sua eficácia na desestruturação celular e inibição de biofilmes. Essas alternativas visam reduzir a dependência de antibióticos e abordar questões de resistência.

As NPs metálicas, como prata e óxido de zinco, destacam-se pela eficácia contra infecções bacterianas multirresistentes. As NPs de óxido de ferro, além de sua

biocompatibilidade, têm sido exploradas em tratamentos para condições como Alzheimer e câncer. Em contextos antibacterianos, tanto as nanopartículas de óxido de ferro quanto as de óxido de zinco biossintetizadas mostram-se promissoras no combate a uma variedade de microrganismos, representando alternativas eficazes contra infecções bacterianas.

As NP podem ser sintetizadas por inúmeras rotas, dentre as quais, os métodos físicos de síntese que se caracterizam por serem rápidos, mas têm baixa pureza. E, os métodos químicos, que são simples, mas geram resíduos tóxicos. Já as sínteses verdes, que utilizam substâncias biológicas, têm ganhado destaque, sendo mais ecológicas e econômicas. Cabe destacar o uso de biomoléculas como polissacarídeos e enzimas que atuam como agentes redutores e estabilizadores. A síntese verde resulta em nanoestruturas compatíveis com sistemas biológicos, destacando-se por sua citocompatibilidade e propriedades biomédicas, tornando-se uma alternativa promissora para aplicações antibacterianas. Dentre as biomoléculas utilizadas na síntese verde, as proteínas desempenham um papel crucial na síntese de nanopartículas (NP), atuando como *templates* para controlar a nucleação e crescimento dessas estruturas nanométricas. Sua capacidade única de auto-organização e interação com compostos as torna ideais para direcionar a formação de NP com propriedades específicas. A estrutura tridimensional das proteínas oferece sítios de ligação específicos para a coordenação precisa com íons metálicos, resultando em NP com morfologias bem definidas. A versatilidade das proteínas permite ajustar as propriedades das NP, como tamanho, forma e estabilidade, por meio de modificações em suas sequências. Essa abordagem biomimética, conhecida como síntese verde, aproveita a eficiência e seletividade das proteínas, permitindo a produção de NP em condições suaves e ecologicamente sustentáveis.

A albumina da clara de ovo e a caseína do leite são utilizadas na síntese de partículas. A albumina é solúvel em água e capaz de amalgamar íons metálicos, aplicando-se na obtenção de NP metálicas, como as de óxido de zinco (ZnO), com propriedades antimicrobianas. A caseína, principal proteína do leite, age como agente redutor eficaz na formação de NP de ZnO, com menor citotoxicidade e maior permeação celular. Ambas são proteínas naturais, biocompatíveis e biodegradáveis, destacando-se na síntese de NP e na indústria alimentícia. A caseína, além de seu

papel nutricional, apresenta propriedades de estabilização, emulsificação, gelificação e ligação à água. A albumina, reconhecida por suas atividades biológicas, contribui como coadjuvante na síntese de NP metálicas, atuando como *biotemplate* e influenciando o controle do pH no processo. Em resumo, a síntese de NP utilizando proteínas como *templates* oferece uma abordagem promissora, combinando eficiência, seletividade e sustentabilidade para aplicações em diversas áreas, incluindo a biomedicina.

A principal proposta deste trabalho residiu na utilização de métodos de síntese verde para a obtenção de partículas superficialmente modificadas com as proteínas acima citadas, devido às suas características de biocompatibilidade. Essas partículas têm o propósito de aplicação antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecalis*, que, como demonstrado, causam danos significativos à saúde animal, principalmente de cães. Portanto, foi avaliado o potencial das partículas para interagir com as proteínas, bem como a sua estabilidade estrutural. Além disso, ao final do processo, avaliou-se a utilização dessas partículas na modificação de filmes de caseína, buscando aumentar a ação antimicrobiana em casos clínicos devido ao aumento da disposição das partículas sobre áreas contaminadas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Obter de partículas metálicas de zinco e ferro, assim como seus possíveis óxidos e conjugados bio-inorgânicos, por meio da utilização das proteínas albumina e caseína, como *biotemplate*. Avaliar a interação metal-proteína e aplicação desses compostos em solução ou incorporados em filmes como antimicrobianos em bactérias causadoras de doenças de pele em cães.

Objetivos Específicos

- Sintetizar partículas de zinco usando como *biotemplates* as proteínas caseína e albumina.

- Sintetizar partículas de ferro usando como *biotemplates* as proteínas caseína e albumina.

- Produzir filmes a base de caseína e incorporação das partículas de ferro e zinco formadas;

- Avaliar a atividade antimicrobiana das partículas de zinco e de ferro, assim como dos filmes produzidos, frente às bactérias *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecalis*, causadoras de doenças de pele em cães.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DOENÇAS DE PELE EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

Os animais domésticos são comumente acometidos por doenças das mais variadas formas. Dentre as principais, as doenças de pele são um problema comum que afeta muitos animais de estimação. A pele é o maior órgão do corpo canino, composto por duas camadas distintas: a epiderme e a derme,^{1,2} como pode ser observado na Figura 1.

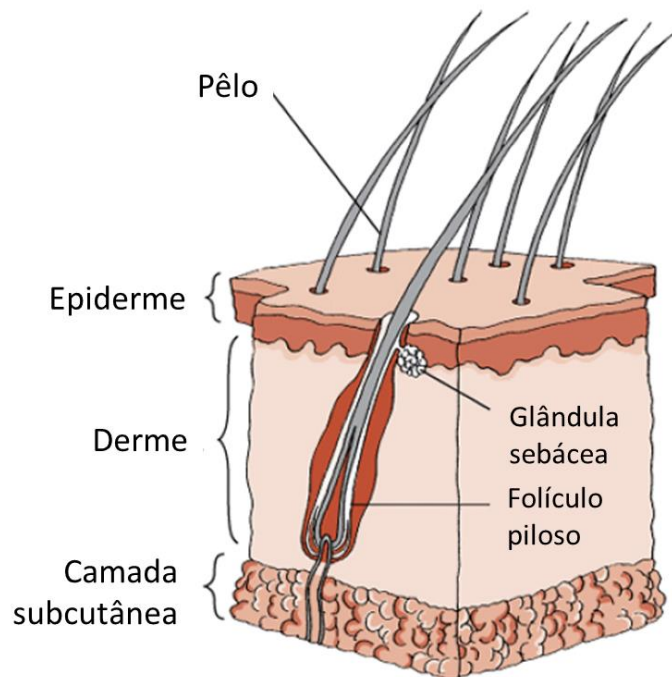


Figura 1. Estrutura da pele canina. (Adaptado de Karen A. Moriello, 2018).¹

A epiderme, sendo a camada externa resistente e impermeável, é formada por um epitélio escamoso estratificado queratinizado que está constantemente sujeito a desgaste. A derme, situada abaixo da epiderme e de maior espessura, abriga nervos, vasos sanguíneos e raízes capilares. A derme é composta por tecido conjuntivo areolar que inclui fibras de colágeno e elástica.²

A pele desempenha funções essenciais para a proteção e regulação do corpo. A queratinização constante pelos queratinócitos forma uma barreira protetora, enquanto os melanócitos produzem melanina para defesa contra os raios solares. Receptores sensoriais proporcionam sensações cruciais, como ao toque e

temperatura. A regulação térmica envolve transpiração e retenção de ar entre os pelos, adaptando-se às condições ambientais. As glândulas sebáceas secretam sebo, preservando a flexibilidade da pele. A exposição solar contribui para a síntese de vitamina D, crucial para a saúde óssea e geral. Essas funções destacam a importância vital da pele na manutenção do equilíbrio interno e na defesa contra elementos externos.^{1,2}

Portanto, a pele exerce um papel fundamental na saúde e bem-estar dos animais. No caso dos cães, diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento de doenças de pele, incluindo alergias, parasitas, infecções fúngicas (dermatofitoses) ou bacterianas, desequilíbrios hormonais e predisposição genética.^{3,4}

Entre as condições citadas acima, destacam-se as infecções bacterianas. As bactérias estão frequentemente relacionadas às doenças de pele em animais. Infecções bacterianas da pele, denominada pioderma (Figura 2A e 2B), podem ocorrer quando a barreira cutânea é comprometida, permitindo que bactérias invadam a pele. Sua transferência para a pele ocorre por meio de cuidados com a pelagem ou outras atividades. Infecções sem um fator subjacente são raras, sendo que quase qualquer condição de pele pode propiciar uma infecção. Os principais desencadeadores dessas infecções incluem alergias, distúrbios de queratinização e doenças foliculares. Em piodermas profundas, outros organismos não residentes, como *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp. e *Mycobacteria* spp., podem ser detectados na pele e isolados.



Figura 2. (A) Dermatite facial em Bulldog Inglês. (B) Pápulas eritematosas, pústulas e colarinhos epidérmicos em um cachorro com foliculite bacteriana. (Adaptado de A. HEINRICH *et al.*, 2019).⁴

A recorrência primária ou esporádica de pioderma superficial é rara, e praticamente todos os piodermas recorrentes são secundários a distúrbios cutâneos ou sistêmicos subjacentes, como ectoparasitas, hipersensibilidades, endocrinopatias e defeitos de queratinização. A maioria dos piodermas em cães está associada a estafilococos coagulase-positivos, sendo *Staphylococcus pseudintermedius* a espécie mais comum.^{3,4}

Dentre as principais bactérias isoladas de peles de cães e causadoras de problemas, destacam-se dois gêneros, *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Das quais, suas características e consequências serão discutidas a seguir.

3.2. BACTÉRIAS CAUSADORAS DE DOENÇAS DE PELE EM CÃES

3.2.1. *Staphylococcus pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius é a principal causa de piodermite canina (Figura 3), frequentemente presente em infecções auriculares e em feridas. Uma análise mais aprofundada das sequências de *Staphylococcus spp.* revelou que o *S. pseudintermedius* é a espécie estafilocócica mais abundante em todos os tipos de amostras⁵ (Figura 4). Esta espécie pode também complicar casos de pododermatite linfocítica-plasmocítica e é a espécie de estafilococos mais comum em infecções urinárias caninas.⁵⁻⁷ Até pouco tempo, ainda era confundido com a espécie *intermedius*, sendo diferenciado somente a partir de 2005, ano de sua identificação.⁸



Figura 3. Pioderma em um Pastor Alemão com ulceração, secreção purulenta e formação de crostas na virilha. (Adaptado de A. HEINRICH et al., 2019).⁴

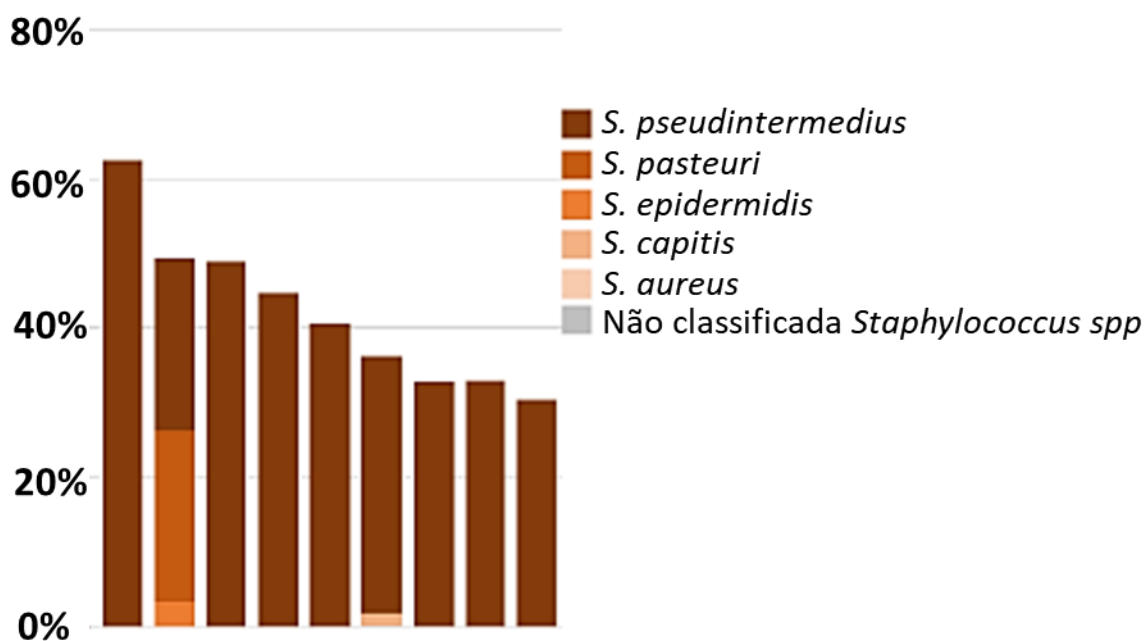


Figura 4. Recorrência de diferentes espécies de bactérias *Staphylococcus spp* em 9 animais estudados. (Adaptado de Older *et al.*, 2020).⁵

A presença da *S. pseudintermedius* na pele dos cães não sinaliza infecção, mas um aumento na sua quantidade é indicativo de uma infecção. Geralmente presente na flora dos cães, é inofensiva, a menos que a resistência do hospedeiro seja diminuída ou a barreira cutânea seja alterada por condições como dermatite atópica, procedimentos médicos ou cirúrgicos, e distúrbios imunossupressores.⁹⁻¹¹

Além da infecção em cães, a *S. pseudintermedius* causa grande preocupação em relação à contaminação de humanos, principalmente aqueles que mantem contato direto com cães domésticos, ou seja, um caso de zoonose preocupante.^{12,13} Em um estudo de Somayii *et al.* (2016)¹² considerando 24 casos das mais variadas complicações em pele humana, pode-se observar a presença de *S. pseudintermedius* em todos os casos. Essa bactéria estava presente, frequentemente, em ambientes polimicrobianos, causando principalmente infecções de pele e tecidos moles de intensidade leve a moderada, semelhantes às descritas em espécies caninas.¹² Riegel *et al.* (2011)¹⁴ relataram em seu estudo, um caso em que houve contaminação de uma pessoa idosa pelo contato com animal doméstico, causando endocardite. Há relatos

também de contaminação após procedimentos cirúrgicos, como é o exemplo da contaminação após retirada de carcinoma do rosto (Figura 5). Neste caso, os autores relataram ser uma contaminação concomitante à infecção por COVID-19, o que atenuou os efeitos colaterais na paciente de ambas as enfermidades.¹⁵



Figura 5. Infecção por *Staphylococcus pseudintermedius*, no 11º dia pós-operatório. Fotografia externa do paciente no 11º dia pós-operatório, demonstrando crostas amarelas ao longo da pálpebra inferior esquerda e couro cabeludo; e leve eritema, edema e induração.¹⁵

3.2.2. *Enterococcus faecalis*

Bactérias *Enterococcus spp* são Gram-positivas, catalase-negativas, anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos.¹⁶ São microrganismos comensais no trato gastrointestinal de mamíferos, geralmente caracterizados por baixa virulência. No entanto, seu potencial patogênico é elevado devido à capacidade de crescer em uma variedade de ambientes, incluindo aqueles hipertônicos, hipotônicos, ácidos, alcalinos, aeróbicos e anaeróbicos facultativos. Isso permite a colonização em áreas como bile, sangue e urina de cães.^{17,18} Entre os cães, as *E. spp.* ocupam a posição de quarto ou quinto isolado mais frequente em casos de bacteriúria.¹⁹ Mais de 50 espécies foram descritas, mas *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais detectadas tanto em humanos quanto em animais.¹⁶

Em um estudo de Wood *et al.* (2020)¹⁹ foram identificados 126 casos de bacteriúria por *Enterococcus*, dos quais 83 eram de cães distintos. Destes 83, 70 apresentaram crescimento bacteriano significativo para *E. spp*, sendo que 43 estavam relacionados com *E. faecalis*, ou seja, em torno de 61% dos casos.

Em humanos, além dos efeitos no gastrointestinal, existem relatos de contaminação de pele ²⁰, como é o caso de uma paciente de 63 anos, diabética, que apresentou-se queixando-se de edema, vermelhidão e dor na panturrilha direita. Exames laboratoriais detectaram *E. faecalis* sensível a amino penicilinas, tedizolida, daptomicina e vancomicina. ²¹ Devido à alta taxa de incidência de animais domésticos colonizados por esta bactéria, se faz necessário o cuidado para o risco de uma possível zoonose. ²²

3.3. TRATAMENTOS

O tratamento para as doenças causadas pelas bactérias acima citadas consta principalmente do uso de antibióticos. Nesses tratamentos, recomenda-se inicialmente o tratamento tópico, afim de minimizar o risco de resistência bacteriana. ⁴ Agentes tópicos como peróxido de benzoíla e clorexidina mostram eficácia contra a piodermite superficial, sendo a clorexidina comparável à amoxicilina-clavulanato sistêmica. ⁴

Devido ao uso extensivo de antibióticos, o *S. pseudintermedius* passou a se tornar resistente à meticilina e é globalmente reconhecido por sua resistência a β -lactâmicos e por apresentar frequentemente um perfil de resistência a múltiplos medicamentos. ^{23,24} Comparativamente, as cepas suscetíveis à meticilina também podem exibir resistência a penicilina, ampicilina, oxitetraciclina, cefoxitina, fluoroquinolonas e levofloxacina. ²⁵⁻³⁰ Em um estudo comparativo entre os anos 2010 e 2021 (Figura 6), pode-se observar o aumento de resistência do *S. pseudintermedius* à 13 antibióticos durante mais de uma década. Destes 13 antibióticos, apenas 2 não apresentaram diferença significativa durante os anos (cefalotina e sulfonamidas), os demais tiveram aumento da resistência ²⁹, o que também corrobora com outros estudos. ³¹

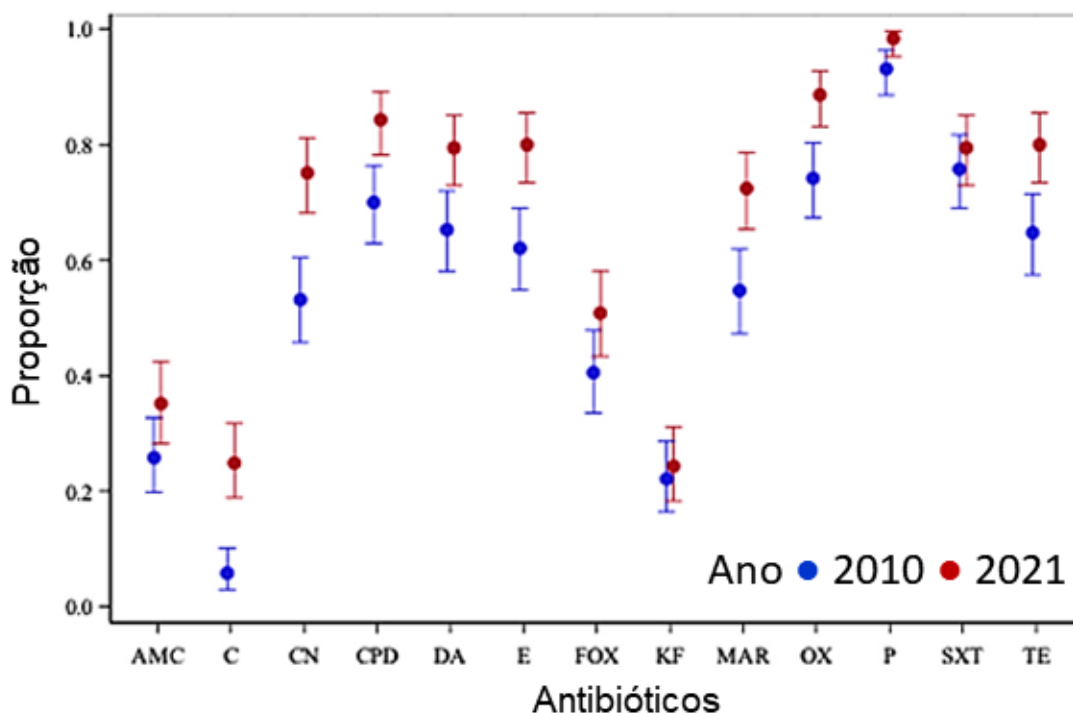


Figura 6. As proporções e os intervalos de confiança de 95% de cada antibiótico comparados entre 2010 e 2021 para amoxicilina/clavulanato (AMC), cloranfenicol (C), gentamicina (CN), cefpodoxima (CPD), clindamicina (DA), eritromicina (E), cefoxitina (FOX), cefalotina (KF), marbofloxacina (MAR), oxacilina (OX), penicilina (P), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) e tetraciclina (TE).²⁹

O tratamento típico para infecções causadas pelo *E. faecalis*, uma bactéria gram-positiva, geralmente envolve o uso de antibióticos específicos. Entre os agentes mais comumente prescritos estão a vancomicina, a qual ocorre resistência por parte da bactéria, e a ampicilina associada a um inibidor de beta-lactamase, como a sulbactam.^{32,33} Outro exemplo é a aquisição de genes que conferem resistência em níveis elevados à estreptomicina ou gentamicina, e a magnitude das concentrações inibitórias mínimas para a ampicilina que eliminou a possibilidade de aproveitar o sinergismo entre esses dois compostos para a terapia.³⁴ Em estudo de KuKanich (2015)¹⁷ foi possível determinar a resistência à ampicilina, amoxicilina, enrofloxacin, oxacilina, penicilina, ticarcilina e demais antibióticos. Em outro estudo no qual foram avaliadas úlceras na pele, também foram encontradas 5 contaminações por *E. faecalis*, sendo que houve resistência ao tratamento dessas ulcerações por

administração oral de moxiflacina, tigemicina, vancomicina, penicilina e ciprofloxacina.

35

Alguns métodos alternativos são utilizados como forma de tratamento antimicrobiano com a finalidade de contornar os problemas de resistência acima citados, fazendo com que o uso de antibióticos seja diminuído e/ou evitado. Diversos são os materiais e substâncias que vem sendo estudados como alternativa aos antimicrobianos, afim de potencializar a eficiência no tratamento de doenças de pele. Cabe destacar o uso de extratos de plantas³⁶⁻³⁸ e nanomateriais.³⁹ Os nanomateriais, em particular as nanopartículas, têm sido cada vez mais estudadas, principalmente pela ampla gama de formas de obtenção, funcionalidade, tamanho e incorporação com materiais biocompatíveis.

Dentre as partículas ou nanopartículas (NPs), as metálicas e de óxidos metálicos têm cada vez sendo mais estudadas para aplicação como antimicrobiano. As partículas metálicas atuam por meio de uma interação direta com as células de patógenos, rompendo as membranas celulares e causando a morte da bactéria. A eficácia da ação antimicrobiana pelas NP se dá através de vários mecanismos, o que inclui a desestabilização das membranas celulares, indução de espécies reativas de oxigênio, interferência no metabolismo bacteriano e inibição da formação de biofilme.⁴⁰

Estudos indicam a utilização das mais variadas partículas ou NP metálicas, tais como partículas de prata⁴¹, cobre⁴², titânio⁴³, ferro e zinco como antimicrobianos para tratamento de doenças.

3.4. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E ÓXIDO METÁLICAS

Segundo a IUPAC, o termo nanomaterial se refere ao material que em pelo menos um dos domínios de fase tem pelo menos uma dimensão da ordem de nanômetros.⁴⁴ As NP possuem inúmeras propriedades que lhe garantem funcionalidades próprias, diferenciando-as de quando estão no seu estado sólido estendido.⁴⁵ Essa mudança significativa está atrelada diretamente ao tamanho da nanopartícula, sua forma, o meio em que estão presentes e a forma de agregados.⁴⁶ Sendo que a principal razão para a diferença no seu comportamento em relação aos

materiais em seu estado sólido expandido está relacionada a sua alta área superficial, e então, sua fácil interação com o meio. ^{47,48}

As nanopartículas possuem uma ampla gama de aplicações, desde áreas médicas e farmacológicas, passando pela engenharia e ciências, energia, área forense entre outros. Entre as principais aplicações podemos citar: desenvolvimento de novos fármacos⁴⁹; *drug delivery* ^{50,51}; fotocatalise ⁴⁹; tratamentos para câncer ⁵²⁻⁵⁵; cosméticos e semelhantes ⁴⁹; células solares ⁴⁹; catálise ^{49,56}; microeletrônica ⁴⁹; aplicação antimicrobiana ^{57,58}; aplicação forense ⁵⁹⁻⁶²; entre outros.

As nanopartículas metálicas, como prata, ouro, óxido de zinco e outras, mostram-se promissoras contra infecções bacterianas multirresistentes devido às suas propriedades nanoestruturadas. Essas NP agem perturbando a membrana celular, inibindo biofilmes, gerando espécies reativas de oxigênio e interferindo em processos intracelulares. Essa estratégia oferece uma alternativa eficaz para combater a resistência bacteriana a múltiplos medicamentos. ⁶³

Entre as diversas nanopartículas de óxidos metálicos, é relevante focar nas nanopartículas de óxido de ferro, as quais têm sido amplamente investigadas para tratamento de doenças devido à sua biocompatibilidade e à variedade de formas pelas quais podem desencadear atividade terapêutica. ⁶⁴ Estudos anteriores já exploraram o uso dessas nanopartículas no tratamento de condições como Alzheimer, Parkinson e câncer. ⁶⁴ No contexto do câncer, as nanopartículas de óxido de ferro demonstraram vantagens ao reduzir a toxicidade em comparação com certos medicamentos anticâncer, incluindo docetaxel, mitoxantrona, cisplatina e carboplatina. Isso resulta em uma melhoria na eficácia da administração de fármacos para tumores, simultaneamente permitindo a redução da dose necessária para atingir a eficácia terapêutica.

Além disso, o ferro e seus óxidos constantemente são avaliados frente a patógenos bacteriano *E. typhi*, *C. albicans*.⁶⁵ No artigo de revisão de Gudkov *et al* (2021) ⁶⁶ são citadas mais de 20 cepas bacterianas com susceptibilidade a ação de nanopartículas de ferro, como *E. coli*, *E. hirae*, *S. epidermidis*, entre outras.

Também foi observada atividade antibacteriana em nanopartículas de óxido de zinco biossintetizadas, demonstrando eficácia contra uma ampla variedade de

microrganismos, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B.subtilis*, *Klebsiella Pneumonia*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*.^{67,68} Além disso, as NP de ZnO são compatíveis e seguras à pele humana. As nanopartículas de ZnO mostraram efeitos bactericidas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.⁶⁹ A atividade antibacteriana está associada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos à membrana celular, além de interações tanto das ZnONP quanto dos íons de zinco com componentes intracelulares.⁷⁰ Além disso, A atividade antimicrobiana das NPs de ZnO aumentou com o aumento da concentração e ocorreu devido à liberação de íons Zn^{2+} , que estenderá a fase de latência do crescimento microbiano. O Zn^{2+} pode entrar na parede celular do microrganismo e reagir com componentes internos para alterar a viabilidade da célula.⁶⁷

3.5. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Tratando-se das NP metálicas, as técnicas de obtenção são muito semelhantes para os variados metais. Duas abordagens principais são adotadas na síntese das nanopartículas metálicas, são elas: *top-down* e *bottom-up* (Figura 7). A abordagem *top-down* inclui ablação a laser, moagem mecânica, pulverização e corrosão, e é originalmente empregada para diminuir o tamanho das partículas. Já a abordagem *bottom-up* na síntese de nanopartículas consiste em construir estruturas nanométricas a partir de componentes moleculares ou iônicos, começando do nível molecular ou atômico.⁷¹

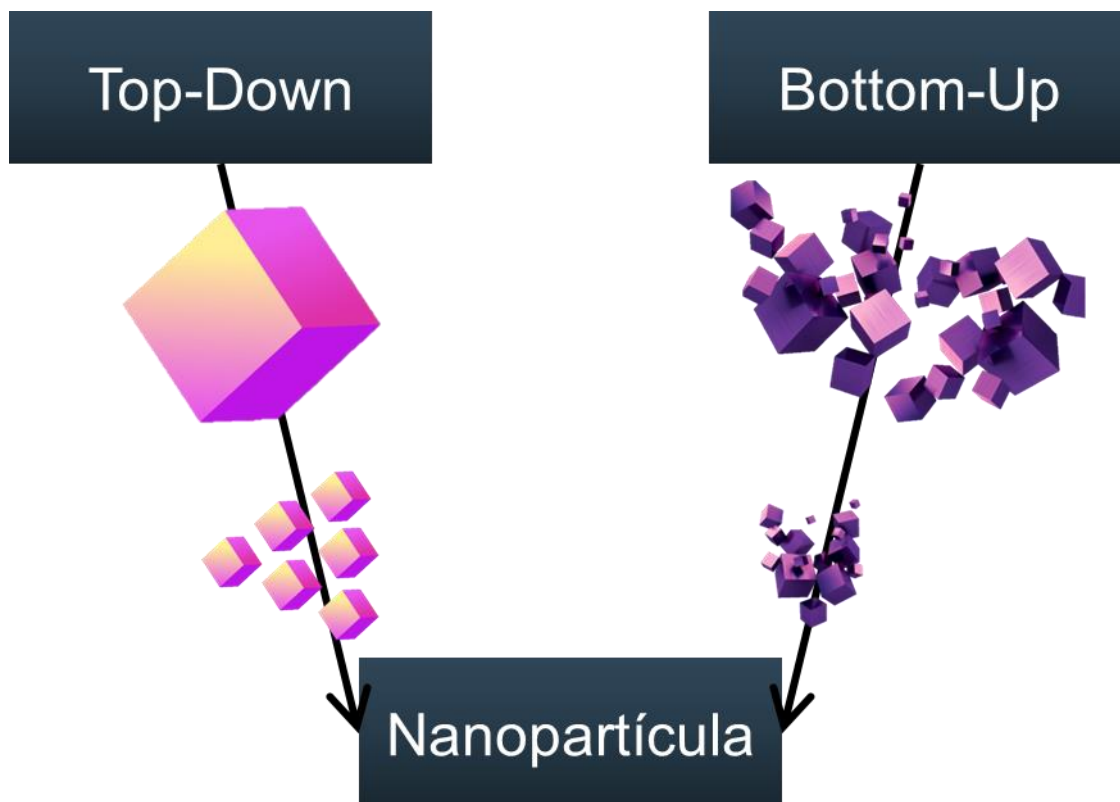


Figura 7. Rotas para obtenção de nanopartículas.

Algumas das técnicas convencionais são descritas a seguir:

- a) Sol-gel: processo amplamente utilizado na obtenção de NP de óxidos de metal, no qual a partir de uma solução forma-se um gel, que por sua vez passa por reações de hidrólise e polimerização, seguido de vaporização dos solventes e aquecimento para obtenção final das NP ;⁷²
- b) Hidrotérmica: ocorre em recipiente específico denominado autoclave onde é exercida alta pressão e temperatura, fazendo com que os materiais insolúveis (no caso metais) sejam dissolvidos;⁷²
- c) Microemulsão: é definida como uma dispersão isotrópica termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis na presença de um surfactante apropriado. Com a forte agitação realizada no meio, as gotículas de água presentes no meio microemulsionado levam a uma interação entre os reagentes internos e externos a emulsão, resultando em uma reação de precipitação em nanogotículas e crescimento de nucleação, com NP estabilizadas pela presença do surfactante;^{72,73}

- d) Ablação a laser: ocorre a remoção de íons metálicos de uma superfície metálica por meio de um feixe de laser;⁷²
- e) Moagem de alta energia: como o nome sugere, são utilizadas bolas rígidas em um moinho agitador de alta energia para produção das NP.⁷⁴
- f) Descarga de arco: no qual precursores metálicos são comumente inseridos em uma cavidade perfurada em um eletrodo de grafite e, posteriormente, submetidos à vaporização por arco;⁷³

Os métodos convencionais possuem muitas vantagens, porém também apresentam desvantagens. Os métodos físicos se caracterizam por apresentarem um tempo relativamente curto de obtenção, alto rendimento e ausência de produtos químicos perigosos, porém apresentam baixa pureza, desgaste mecânico do equipamento de obtenção e controle limitado da morfologia e tamanho das partículas.^{75,76} Já os métodos químicos apresentam como vantagem uma reação razoavelmente rápida, temperatura de reação branda, simplicidade e além disso, reagentes como surfactantes podem auxiliar no controle e distribuição de tamanho das partículas. Porém, apresentam uso excessivo de reagentes, assim como geração de resíduos líquidos em grande quantidade e que podem ser tóxicos, além de baixo rendimento.⁷⁶⁻⁷⁸ Devido a estes fatores, novas metodologias são propostas, como é o caso das denominadas sínteses verdes.

3.5.1. Sínteses verdes

A síntese verde consiste na obtenção de partículas e NPs por meio de reações e rotas mais ambientalmente corretas. As sínteses verdes de NPs se baseiam na utilização de plantas e seus extratos,⁷⁹⁻⁸³ microrganismos⁸⁴⁻⁸⁷ e moléculas naturais.⁸⁸⁻⁹²

Na síntese de nanopartículas por métodos verdes, substâncias de origem biológica desempenham papéis cruciais, atuando como agentes redutores, encapsulantes, estabilizadores e ligantes. Biomoléculas como polissacarídeos, enzimas, proteínas e peptídeos são utilizadas como agentes redutores e estabilizadores, enquanto aminas, tióis e fosfinas são empregados como ligantes. Esses componentes biológicos podem ser derivados de plantas, microrganismos ou

extratos, tanto em configurações intracelulares quanto extracelulares, em células vivas ou inativadas. Além disso, biomodelos como DNA, membranas e vírus são explorados nesses processos. A síntese biológica de NP envolve a combinação de um composto precursor de metal com um agente biológico sob condições específicas, sendo comum o uso de compostos metálicos como AgNO_3 , HAuCl_4 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$, entre outros, para a produção de diferentes NP metálicas.⁷⁰

A síntese verde tem como princípio fundamental a redução dos metais e estabilização das partículas formadas por meio de métodos limpos, de fácil realização e pouco ou não prejudiciais ao meio ambiente. Isto se baseia principalmente na presença de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas, que funcionam como agentes redutores e estabilizantes.^{76,93,94}

A síntese verde possibilita a produção de nanoestruturas por meio de métodos simples, ecológicos e econômicos, utilizando organismos vivos e biomoléculas naturais. Vale ressaltar que os produtos resultantes desses métodos apresentam uma maior compatibilidade com sistemas biológicos.⁹⁵ Além disso, as biomoléculas envolvidas na síntese das nanopartículas atuam como estabilizantes naturais, não apenas prevenindo a agregação, mas também contribuindo para a estabilização das mesmas.⁹⁶ As nanopartículas produzidas dessa maneira têm demonstrado melhorias na citocompatibilidade e propriedades biomédicas em comparação com aquelas geradas pelos métodos tradicionais, destacando-se como excelentes agentes antibacterianos ou anticâncer.⁹⁷

As moléculas naturais, em especial as proteínas, surgem como potencial aplicação na produção de nanopartículas. Isso se deve a sua baixa toxicidade, custo relativamente baixo e reação de baixa complexidade.

3.5.2. Proteínas como *templates*

As proteínas desempenham um papel fundamental como *templates* na síntese de nanopartículas, proporcionando um meio altamente controlado e específico para a nucleação e crescimento dessas estruturas em escala nanométrica. A capacidade única das proteínas de se auto-organizarem e interagirem com diferentes compostos as torna excelentes candidatas para direcionar a formação de nanopartículas com propriedades desejadas. A estrutura tridimensional das proteínas oferece sítios de

ligação específicos, permitindo a coordenação precisa com íons metálicos ou precursores, resultando em nanopartículas com morfologias bem definidas. Além disso, a versatilidade das proteínas permite a modificação de suas sequências para ajustar as propriedades das nanopartículas, como tamanho, forma e estabilidade. Essa abordagem biomimética aproveita a eficiência e a seletividade das proteínas, abrindo caminho para a produção de nanopartículas sob condições suaves e ecologicamente sustentáveis. Cabe destacar dentre as proteínas usadas como *template* para síntese de NP, a albumina e a caseína.

3.5.2.1. Caseína

As caseínas desempenham um papel vital no transporte de nutrientes do leite da mãe para a prole lactente. É a principal proteína encontrada no leite, de baixo custo, amplamente disponível, não tóxica e altamente estável. Como se trata de uma substância alimentar natural, é biocompatível e biodegradável.⁹⁸ A caseína é composta pelas subunidades α S1- caseína, α S2- caseína, β - caseína e κ -caseína (Figura 8), que formam micelas de caseína no leite.⁹⁹ As características de cada porção proteica são apresentadas na Tabela 1. Seus pesos moleculares estão entre 19 e 25 kDa e seu ponto isoelétrico (pI) médio está entre 4,6 e 4,8.⁹⁸ A α S2-caseína desempenha um papel importante no transporte de fosfato de cálcio. Seu peptídeo antimicrobiano casocidin-I tem a capacidade de inibir o crescimento de *E. coli* e outras bactérias. A κ -caseína cobre predominantemente a superfície das micelas, formando uma camada hidrofílica carregada, que estabiliza as micelas por meio de repulsão eletrostática e barreira estérica intermicelar.¹⁰⁰

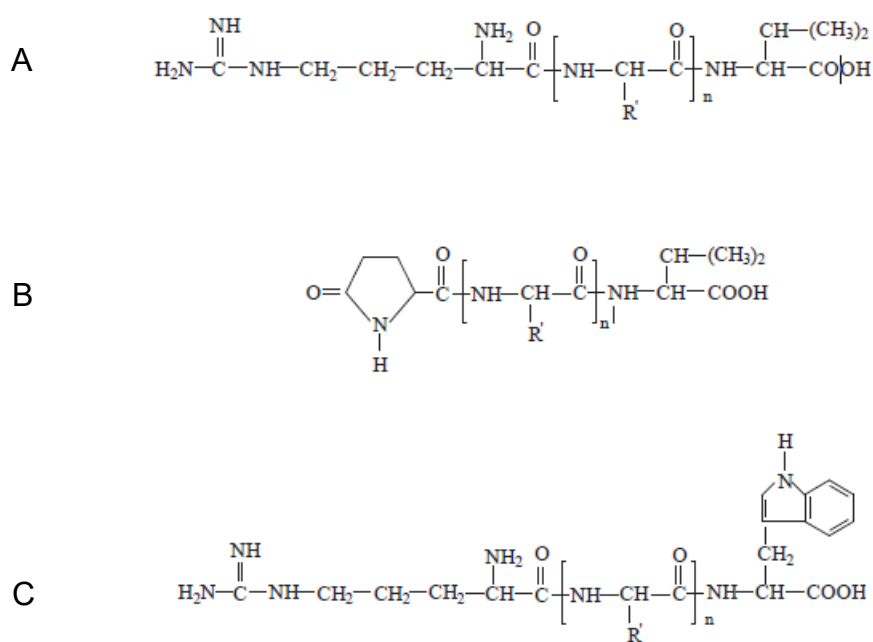


Figura 8. Fórmula estrutural da β -caseína (A), κ -caseína (B) e α -caseína (C).

Tabela 1. Características gerais das moléculas de caseína.

Subunidades	α_{s1} - caseína	α_{s2} - caseína	β -caseína	κ -caseína
Peso Molecular (kDa)	23,61	25,23	23,98	19,02
Nº de aminoácidos totais	199	207	209	169
Nº de resíduos fosfoserinas	8	11	5	1
Resíduos não polares (%)	36	40	33	33
Glicosilação (%)	0	0	0	0-5
Ponto Isoelétrico	5,1	-	5,3	4,1

Fonte: Wusigale; Liang; Luo, 2020.¹⁰¹

As caseínas possuem estrutura aberta e rica em prolina, permitindo várias conformações favoráveis em solução. A presença de peptídeos de prolina interrompe as fitas alfa-hélice e beta, e a ausência de pontes dissulfeto resulta em pouca estrutura secundária ou terciária. Isso lhes confere uma estabilidade térmica.¹⁰² As caseínas são proteínas anfífilas que se organizam espontaneamente em micelas estáveis em soluções aquosas (Figura 9). Essas micelas de caseína são compostas por numerosas unidades complexas de caseinato de cálcio, levemente compactadas, unidas por uma combinação de cálcio e ligações de fosfato de cálcio coloidal e citrato entre fosfoserina de caseína e grupos carboxila. Ligações hidrofóbicas e pontes de caseinato de cálcio estabilizam as submicelas, enquanto o fosfato de cálcio coloidal ajuda a agregar as submicelas na estrutura micelar.¹⁰³ Todas as proteínas de caseína, em seus estados nativos, não possuem uma estrutura terciária ou secundária bem definida.¹⁰⁴ A caseína é classificada como uma proteína intrinsecamente desordenada, implicando que a proteína é funcional em sua forma não estruturada.¹⁰⁵ Outra característica única das caseínas é a grande quantidade de resíduos de prolina, especialmente no caso da β -caseína, o que afeta significativamente a estrutura secundária e terciária das caseínas.¹⁰⁶ Além disso, todas as proteínas de caseína possuem diferentes regiões hidrofílicas e hidrofóbicas ao longo da cadeia proteica.¹⁰⁷ Contêm 32–42% de aminoácidos não polares, o que as torna altamente hidrofóbicas, mas devido à presença de um grande número de aminoácidos fosfatados e sulfurados e carboidratos na k-caseína, elas são bastante solúveis em solventes aquosos.¹⁰⁸

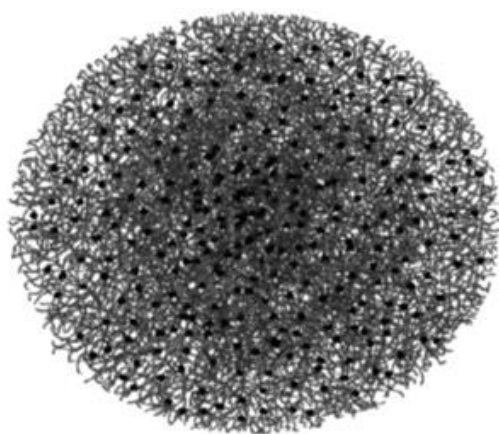


Figura 9. Modelo de nanocluster para micelas de caseína (estruturas filamentosas) e nanoclusters de fosfato de cálcio (círculos escuros). (Adaptado de Qi (2007)).¹⁰⁹

Além de facilitarem a transferência nutricional, as micelas também transportam minerais essenciais para o crescimento ósseo do recém-nascido. A atividade superficial das caseínas as torna valiosas na indústria alimentícia, onde são usadas como estabilizadores de emulsão.

A caseína possui inúmeras propriedades, tais como propriedades de ligação de íons e pequenas moléculas, excepcionais propriedades de estabilização, excelentes propriedades de emulsificação e automontagem, juntamente com excelentes capacidades de gelificação e ligação à água.¹⁰² Além disso, a caseína possui várias capacidades de blindagem, essenciais para proteger cargas úteis sensíveis, permitindo controlar a bioacessibilidade do bioativo e promover sua biodisponibilidade.¹¹⁰

A caseína, foi identificada como um agente redutor eficaz, facilitando a formação de nanopartículas de óxido de zinco através da redução do nitrato de zinco. Este estudo demonstrou que a caseína permaneceu funcionalizada nas nanopartículas, resultando em menor citotoxicidade e maior permeação celular⁵⁸. A caseína também foi utilizada na obtenção de NP como proposto por Ma *et al* (2019)⁵⁷ e Somu *et al* (2018).⁵⁸ Em ambos os trabalhos a caseína foi utilizada como *template* para a obtenção de NP de ZnO, as quais foram eficientes em relação à atividade antimicrobiana, foram produzidas por meio de síntese limpa, rápida e econômica, além de apresentarem formas e tamanhos nanométricos.

3.5.2.2. Albumina

A clara de ovo possui cerca de 54% de ovalbumina, seguido de ovotransferrina (12%) e ovomucóide (11%). A ovalbumina, uma glicoproteína fosforilada composta por três subunidades completas, cada uma contendo diferentes grupos fosfato, além de um grupo de carboidrato ligado ao seu grupamento N-terminal.¹¹¹ A ovalbumina tem um peso molecular de 45 kDa, é composta por 385 aminoácidos, possui ponto isoelétrico igual a 4,5 e temperatura de desnaturação de 84°C. Além disso, possui 6 resíduos de cisteína (pontes dissulfeto). Cerca de 50% dos resíduos de aminoácidos na ovalbumina são hidrofóbicos, enquanto aproximadamente um terço é composto por resíduos ácidos, resultando no pI ácido citado. Quanto à estrutura secundária, a

ovalbumina apresenta 30% de hélice alfa e 32% de estrutura de folha beta (Figura 10).^{112,113}



Figura 10. Estrutura quaternária da ovalbumina. (Adaptado de RSCB - Protein Data Bank, 2024).

A ovalbumina em condições controladas de força iônica e pH podem produzir agregados proteicos com tamanhos e morfologias diferentes.¹¹⁴ A ovalbumina desempenha um papel central na formação de géis na clara de ovo. A influência do pH está ligada à sua ação na carga líquida das proteínas e à reatividade dos grupos sulfidrila em valores de pH mais elevados. No estudo de Croguennec; Nau; Brulé, (2002),¹¹⁵ os autores realizaram micrografias eletrônicas de varredura de géis de clara de ovo (Figura 11). Os resultados mostram que, a um pH de 5,0, é observada uma rede de gel grosseira e aberta constituída de agregados aleatórios. A um pH de 7,0, partículas de 100 a 150 nm se agrupam em uma estrutura de "colar de contas" para

formar agregados lineares. A pH 9, é observada uma rede de gel uniforme com tamanhos de partículas de 60 a 80 nm e tamanho mínimo de poro devido a um alto grau de entrelaçamento.

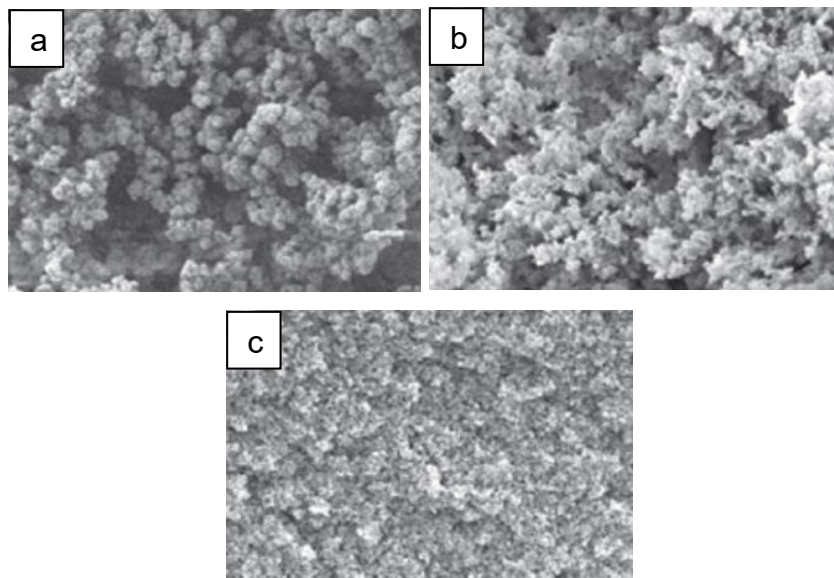


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de géis de clara de ovo em diferentes pH. (a) pH 5,0; (b) pH 7,0 e; (c) pH 9,0. (Adaptado de Croguennec; Nau; Brulé, 2002).¹¹⁵

A ovalbumina também é reconhecida principalmente por sua ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anticancerígenas, anti-hipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras. Também, demonstra atividade antimicrobiana contra diversas cepas de bactérias e fungos. As propriedades hidrofóbicas e carga positiva desses peptídeos desempenham um papel crucial em sua atividade bactericida. Hidrolisados de ovalbumina também contribuem para atividades antimicrobianas e imunoestimulantes.¹¹⁶

A albumina tem sido apontada como coadjuvante na obtenção de nanopartículas metálicas.^{88,117-119} A albumina possui como características a alta solubilidade em água e a capacidade de amalgamar íons metálicos o que lhe confere vantagens na aplicação na obtenção de NP metálicas.⁸⁹ Dentre as NP produzidas utilizando-se a albumina pode-se citar as NP de óxido de zinco, as quais apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias e também biocompatibilidade.⁸⁸⁻⁹¹

A albumina atua como *biotemplate*, ou seja, uma espécie de molde para a formação das partículas.¹¹⁸ Isso se deve principalmente a presença de grupos funcionais que propiciam a estabilização e redução de metais, além da possibilidade de recobrimento das nanopartículas.¹¹⁷ Devido ao fato de a albumina apresentar alta afinidade por íons metálicos, esta proteína é capaz de formar complexos orgânico-inorgânicos. O papel da albumina na síntese de nanopartículas como ZnO é complexo, envolvendo várias hipóteses. A transformação de magnetita em maghemita, neste caso, pode ser desencadeada pela desnaturação parcial da proteína, destacando o papel da estrutura quaternária das proteínas em diferentes condições de reação. Além disso, o pH emerge como um parâmetro crucial na formação de nanopartículas de ZnO, sugerindo que a albumina desempenha um papel significativo ao influenciar o controle do pH durante a síntese.¹²⁰

As propriedades físicas e químicas das proteínas, como tamanho, composição de aminoácidos, carga, estruturas e capacidade de interação, influenciam sua funcionalidade.¹²¹ Devido à diversidade dessas características, é desafiador determinar como cada uma afeta uma função específica.

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES

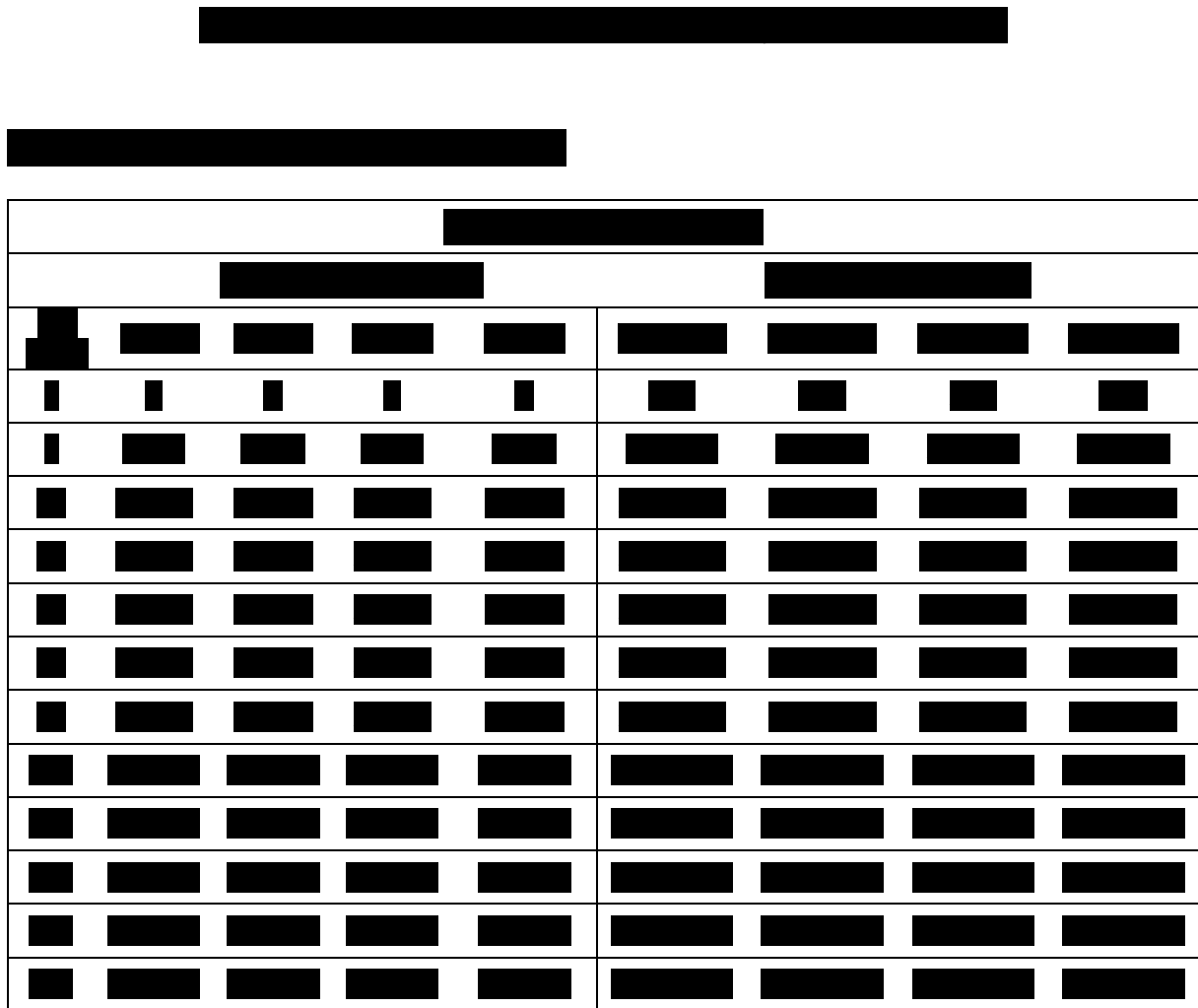
As sínteses foram realizadas em água ultrapura (Milli-Q Millipore). Os reagentes utilizados foram cloreto de zinco P.A. ACS >98% (Sigma-Aldrich, Brasil), cloreto de ferro III hexahidratado P.A. ACS (Neon, Brasil), albumina (Natuovos, Brasil), caseína micelar (Naked Casein - Naked Nutrition, USA), ácido clorídrico 37% (Química Moderna, Brasil) e hidróxido de sódio P.A. (Symth, Brasil).

4.2. SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE ZINCO E DE FERRO USANDO COMO BIOTEMPLATES AS PROTEÍNAS CASEÍNA E ALBUMINA

[REDACTED]

[REDACTED]

FIGURA OCULTA



4.3.DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E DO POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS

Primeiramente, a distribuição de diâmetro das amostras na faixa de 40 nm - 2 mm foi determinada empregando a técnica de difração a laser (Mastersizer 2000 Instrument, Malvern, Reino Unido). Foram determinados os valores das curvas de distribuição de diâmetro, o diâmetro médio ponderado por volume ($D[4,3]v$) e a polidispersidade (Span). A unidade de dispersão (Hydro 2000SM-AWM2002, Malvern, Reino Unido) foi preenchida com água destilada e agitada a 2000 rpm, então, cada amostra foi aplicada gota a gota na unidade úmida até atingir um obscurecimento de 2%.

Posteriormente, o diâmetro hidrodinâmico médio (z-Average) e índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano-ZS®, Malvern Panalytical, Reino Unido), para determinar os diâmetros das populações entre 1 nm e 2000 nm. Os valores de potencial zeta foram determinados pela técnica de mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano-ZS®, Malvern Panalytical, Reino Unido). Para estas análises, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:100, v/v). As medições foram realizadas a 25 °C e a luz espalhada foi detectada em um ângulo de 173° e o índice de refração escolhido foi de 1,330.

4.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada no equipamento de infravermelho (Bruker Alpha Series FTIR, UK) equipado com o espectrômetro de refletância total atenuada (ATR) equipado com cristal de diamante a 45°. Os espectros foram medidos por meio de 24 scans na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

4.5. ANÁLISE DA INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Após síntese das partículas, as mesmas foram analisadas por meio de espectroscopia de fluorescência. Inicialmente foram realizadas avaliações em relação às proteínas sem metal em pH 6, 7, 8, 9 e sem ajuste de pH. Posteriormente, foram realizadas medidas em relação às partículas formadas por proteínas com os metais, nos mesmos valores de pH, para determinação do máximo de intensidade de fluorescência e conseqüentemente escolha do pH de trabalho para cada mistura metal-proteína.

Para tanto, foram realizadas diluições das amostras, em água ultrapura, para que não ocorresse a extrapolação da leitura no equipamento. Essas diluições variaram para cada amostra e condição de ensaio e foram consideradas para o cálculo da intensidade de fluorescência máxima observada.

Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos usando um espectrofluorofotômetro Shimadzu modelo RF-5301PC.S e as larguras de fenda para ambos os monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas em 5,0 nm. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm e varredura de emissão de 250 – 450 nm com a finalidade de investigar a propriedade das diferentes porções de aminoácidos das proteínas, buscando elucidar assim sua interação com o metal.

A partir dos dados coletados foram aplicadas a equação de Stern-Volmer (equação 1) e o duplo logaritmo (equação 2). As equações foram utilizadas com a finalidade de identificar tendência de ajuste linear dos dados, assim como obtenção da constante de Stern-Volmer (K_{sv}), número de sítios de ligação proteína-metal (n) e também a constante de ligação proteína-metal (K_b).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[M] \quad (1)$$

Onde:

F_0 : é a intensidade de fluorescência sem a adição de metal;

F : é a intensidade de fluorescência com a adição de metal

K_{sv} : é a constante de Stern-Volmer e;

$[M]$: é a concentração do metal em mmol L⁻¹.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [M] \quad (2)$$

Onde:

F_0 : é a intensidade de fluorescência sem a adição de metal;

F : é a intensidade de fluorescência com a adição de metal;

K_b : é a constante de ligação;

n : é o número de sítios de ligação e;

$[M]$: é a concentração do metal em mmol L⁻¹.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.

4.7.1. Taxa de absorção de água

Para realização da análise, utilizou-se amostras de filme em duplicada com área de 1 cm². Essas amostras foram imersas em solução tampão de fosfato de sódio pH 6,5 pelos períodos de 0,5; 1,0; 3,0; 6,0 e 24 h. As amostras foram previamente secas em estufa a 40 °C e então pesadas. Após cada intervalo de tempo mencionado, as amostras foram retiradas da imersão e enxugadas com papel filtro para retirada do excesso de tampão que pudesse restar e pesadas. Os cálculos do percentual de absorção de água foram realizados conforme a equação 3:

$$A_{H_2O} = \left(\frac{m_f - m_0}{m_0} \right) \times 100 \% \quad (3)$$

Onde m_f é a massa da amostra após o tempo de imersão e m_0 é a massa da amostra inicialmente seca.

4.7.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A investigação da topografia de superfície e da rugosidade dos filmes foi realizada utilizando a Microscopia de Força Atômica (AFM). Um microscópio de varredura por sonda Multimode 8 (Bruker, EUA) com sondas SCANASYST-AIR (Bruker, EUA) foi empregado. O raio nominal da ponta era de 2 nm, e a constante elástica nominal era de 0,4 N/m. Varreduras de uma área de 1x1 µm foram realizadas com taxa de varredura de 0,9 Hz e resolução de 256 × 256 pixels. Neste caso, o modo ScanAsyst do microscópio de força atômica foi utilizado, e por essa razão, os parâmetros de aquisição foram ajustados automaticamente durante a análise das amostras de superfície. Os dados obtidos foram analisados por dois softwares: o software NanoScope Analysis (Bruker, EUA) e o Gwyddion (software gratuito).

4.8. ENSAIO ANTIMICROBIANO

[REDACTED]

4.9. TESTE ESTATÍSTICO

As diferenças para determinados conjuntos de dados foram analisadas por meio de análises de variância (ANOVA) seguidas pelos testes post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS

As partículas foram sintetizadas em todas as condições previamente definidas. Primeiramente foram realizados os ensaios das amostras sem adição de proteína, ou seja, a solução de metais nas concentrações pré-definidas. As amostras foram previamente avaliadas quanto da interação metal-proteína por meio de fluorescência, onde os valores de pH de 7 e 9 obtiveram os melhores resultados para zinco e ferro, respectivamente. A discussão a cerca desta determinação se dará na seção 5.4.

Em relação às amostras de FeCl_3 ajustada em pH 9 (Figura 13) observa-se a formação de precipitado marrom, característico de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ou óxidos de ferro, sem turbidez aparente.

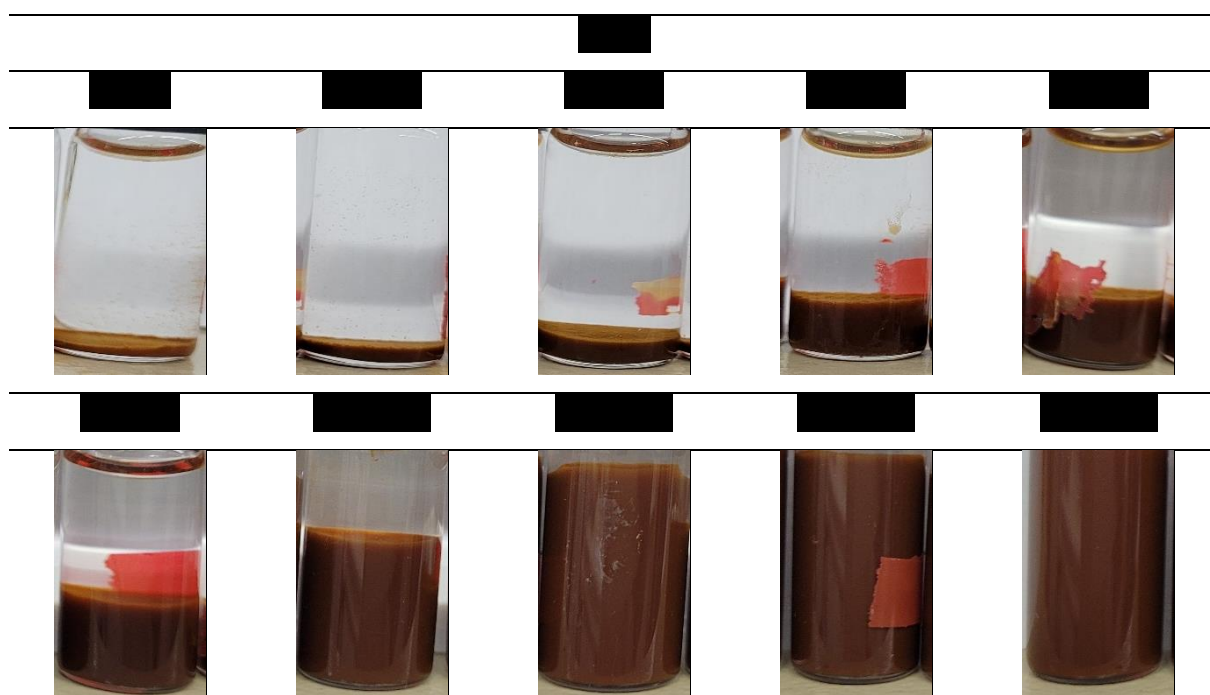


Figura 13. Imagens das amostras contendo o precursor metálico de ferro sem a adição de proteínas e com pH ajustado em 9.

Em relação às amostras com o precursor de zinco (ZnCl_2) em pH ajustado a 7 (Figura 14) observou-se a presença de precipitado branco, característico de óxido de zinco. Vale salientar que em concentrações mais elevadas o sólido formado apresentava característica semelhante a gel.

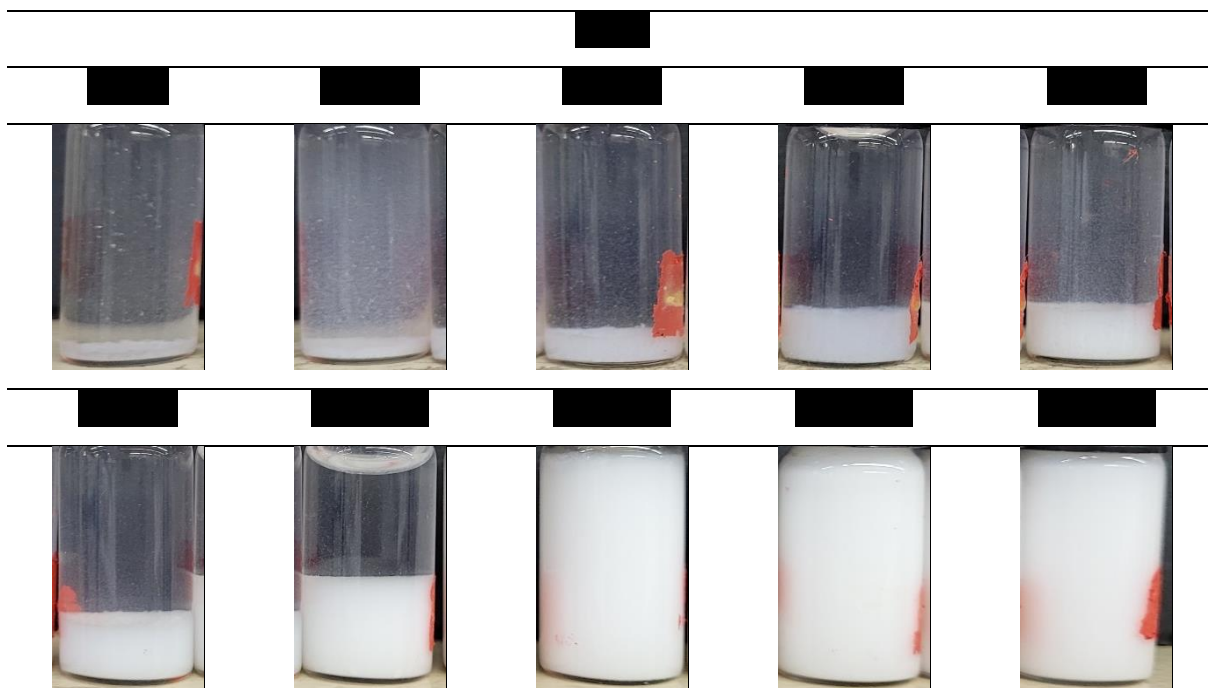


Figura 14. Imagens das amostras contendo o precursor metálico de zinco sem a adição de proteínas e com pH ajustado em 7.

As proteínas também sem ajuste de pH e em pH 2, 7 e 9 são apresentadas na Figura 15. Podemos observar que no caso da albumina não ocorrem mudanças visuais tão significativas, já em relação à caseína observa-se mudança drástica em pH 2, onde é possível observar o desaparecimento da turvação da solução comparado a amostra sem ajuste de pH (maior turvação) e em pH 7 e 9, com menor intensidade de turvação comparada a amostra sem ajuste. A diminuição da turvação deve, provavelmente a mudança da estrutura micelar da caseína neste de pH ácido, fazendo com que possivelmente tenha ocorrido desnaturação da proteína, ou desagregação em partículas menores.

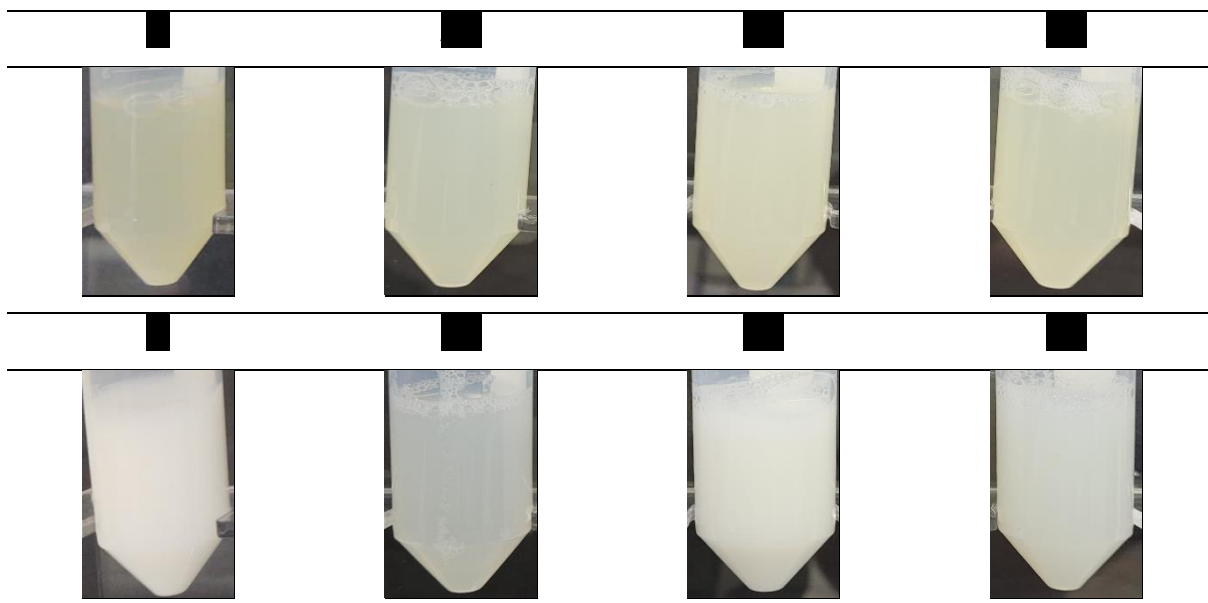


Figura 15. Imagens das amostras contendo a proteína, sem a adição de metais, sem ajuste de pH e em pH ajustado em 2, 7 ou 9.

Logo em seguida, foram preparadas as amostras misturando-se a proteína de interesse (caseína ou albumina) com o precursor metálico de ferro (Figura 16). Essas amostras foram produzidas em duas condições, inicialmente sem o ajuste de pH e após com ajuste de pH igual a 9. O controle de pH inicial das amostras pode ser encontrado em anexo. Ao analisar as imagens para a proteína albumina com o precursor metálico de ferro, podemos observar que quando não foi realizado o ajuste de pH, as amostras apresentaram coloração mais clara em relação às amostras que tiveram seu pH ajustado a 9. Isso se deve potencialmente ao deslocamento do equilíbrio da reação para a formação de hidróxidos ou óxidos de ferro, que possuem coloração marrom.

As amostras sem ajuste de pH apresentaram estabilidade considerável, sem precipitação significativa em todas as concentrações analisadas. O mesmo não ocorreu para as amostras com o pH ajustado, até a concentração de 50mM de ferro adicionado não ocorreu precipitação, em concentrações maiores observou-se precipitação da mistura e a presença de sobrenadante levemente turvo, indicando a possível presença de ferro, nas suas mais variadas formas, livre na solução.

Para as amostras de caseína a característica visual foi semelhante àquela encontrada para as partículas obtidas com albumina. Ocorreram ligeiras precipitações

em concentrações mais elevadas, quando sem ajuste de pH, provavelmente devido a desnaturação da proteína devido ao pH extremamente ácido do meio (em torno de 1). O que difere nesta proteína é que em todas as concentrações não foram observadas precipitações significativas, o que pode indicar uma maior estabilização do metal por esta proteína.

As próximas partículas a serem produzidas, foram aquelas utilizando as proteínas caseína e albumina, mas alterando o precursor metálico para zinco. Foram avaliadas novamente as partículas sem ajuste de pH e no caso do zinco o pH foi ajustado em 7 (Figura 17).

Para as preparações utilizando a proteína albumina observou-se formação de solução ligeiramente amarelada, característica da solução de albumina. No caso das amostras onde não houve ajuste de pH observou-se estabilidade visual das amostras em todas as concentrações avaliadas, sem a presença de precipitado evidente. Já para as amostras onde o pH foi ajustado em 7,0 ocorreu precipitação das partículas em concentrações na faixa entre 10 e 75 mM de Zn adicionado. Isso pode ser um efeito de desnaturação proteica em concentrações inferiores ou desestabilização da proteína.

Os ensaios com a proteína caseína apresentaram formação de precipitados nas concentrações de 10, 25 e 35 mM sem ajuste de pH e 25 e 75mM quando foi realizado o ajuste de pH. Isso corrobora com os ensaios utilizando o metal ferro, onde a caseína demonstrou maior estabilidade visual da partícula formada. Observa-se que somente em condições de menor concentração ocorreram a formação dos precipitados, isso provavelmente se deve às características do meio, como carga e tamanho de partícula formado, o que será discutido posteriormente ao longo texto.

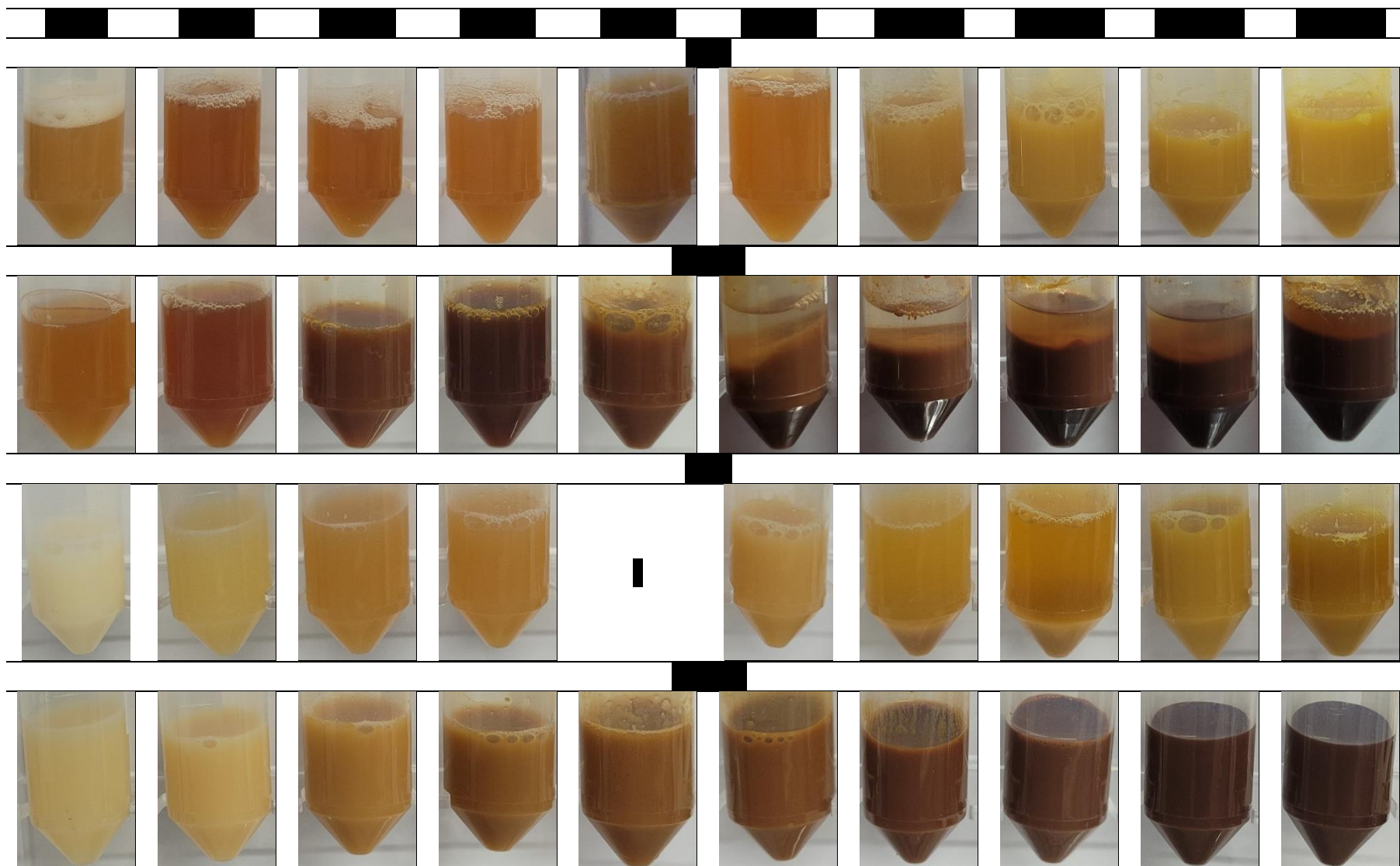


Figura 16. Imagens das amostras de albumina e caseína com ferro, com e sem ajuste de pH.*Não foram realizadas imagens nessa condição.

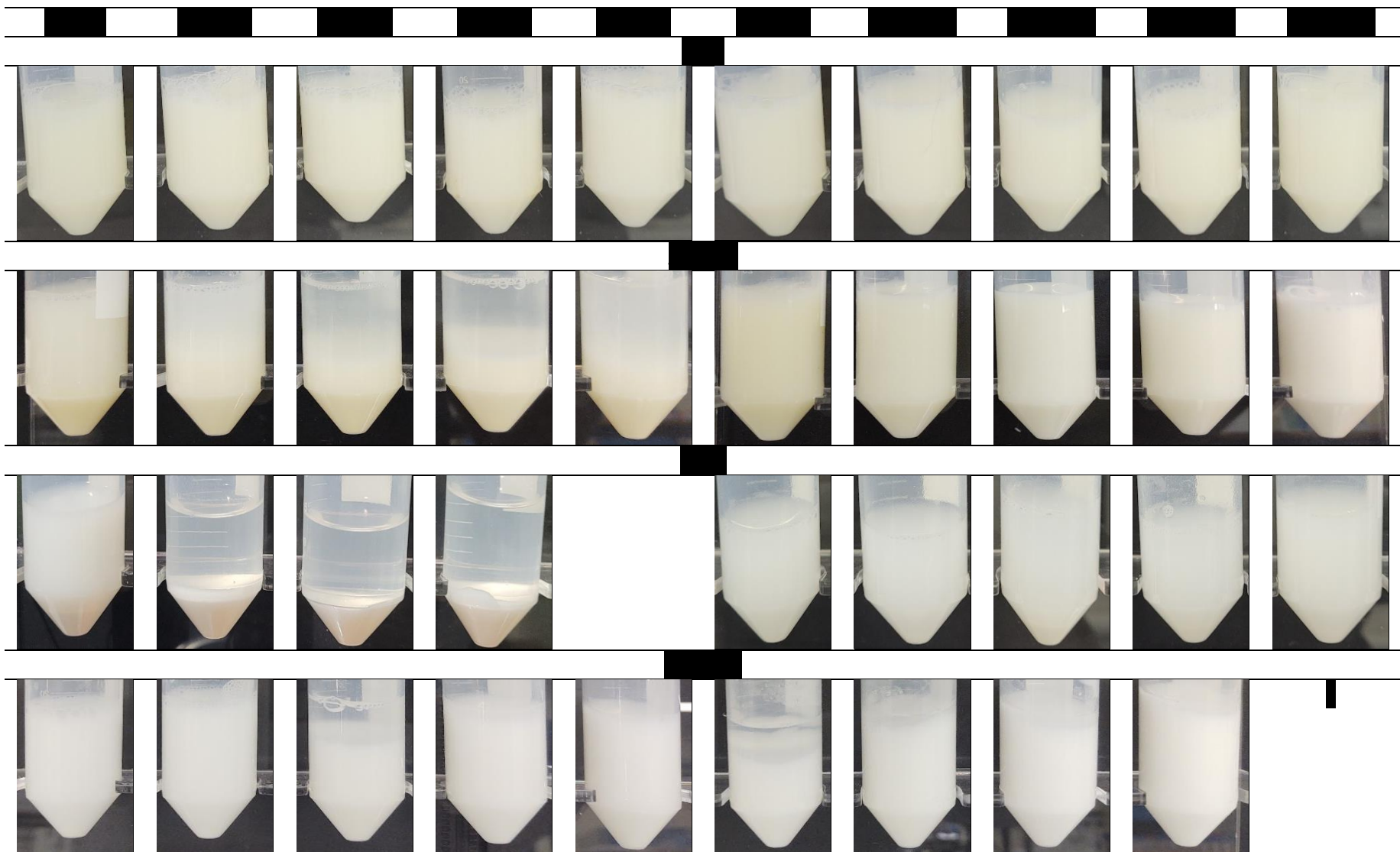


Figura 17. Imagens das amostras de albumina e caseína com zinco, com e sem ajuste de pH. *Não foram realizadas imagens nessa condição.

6.2.DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E DO POTENCIAL ZETA DAS PARTÍCULAS

A compreensão precisa da estrutura e do comportamento de proteínas em solução é de suma importância para avanços significativos na pesquisa biomédica e na indústria alimentícia. Técnicas como o espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o potencial zeta, desempenham um papel vital na caracterização das propriedades coloidais e estabilidade de proteínas, tais como a albumina e caseína. O DLS revela informações cruciais sobre o tamanho efetivo das partículas, proporcionando uma visão detalhada das interações moleculares e agregação. Paralelamente, a potencial zeta oferece informações sobre a carga superficial das proteínas, desempenhando um papel determinante na compreensão da estabilidade de partículas proteicas e de possíveis interações com íons.

Para melhor entendimento do leitor, algumas considerações devem ser esplanadas em relação a forma de apresentação dos resultados a seguir. Os ensaios foram realizados em dois equipamentos distintos. Amostras com tamanho maior de partícula foram analisadas por meio do Mastersizer 2000, onde os resultados apresentados de referem ao diâmetro médio ponderado por volume ($D[4,3]v$) e a polidispersidade (Span). Porém, para melhor avaliação da diversidade de partículas no meio, foi optado por apresentar dados referentes as populações nas faixas de 10% ($d[0,1]$), 50% ($d[0,5]$) e 90% ($d[0,9]$). Nas discussões ao longo do trabalho o enfoque será dado para os valores de $d[0,9]$, devido a representatividade de um maior número de partículas.

As amostras de tamanho menor foram analisadas por meio de Zetasizer Nano-ZS® e são retornados os valores referentes aos picos de distribuição para as amostras, assim como sua intensidade percentual relativa e o índice de polidispersão (PDI), o valor médio (Z-Average), neste caso, não será apresentado devido ao entendimento da análise dos picos ser mais apropriada.

Inicialmente, foi avaliada a conformação e estabilidade da albumina em solução, sem ajuste do pH (pH aproximadamente 10) e ajustando-se o pH com HCl para os valores de 9 e 7. Esses pHs foram previamente avaliados frente a interação das proteínas com os metais, onde foram observadas melhores interações da

proteína albumina com ferro e zinco, respectivamente, nos pHs 9 e 7. Também foi avaliado o efeito do pH 2 na estrutura e estabilidade da proteína, visto que ao adicionar os metais, o pH diminuiu consideravelmente até valores próximos a este. Para a proteína caseína também foram realizados ajustes de pH nos valores de 2, 7 e 9.

Os tamanhos das soluções contendo a albumina sofreram variações significativas com as variações de pH (Tabela 2). Na solução de albumina sem ajuste de pH (pH 10,0) observou-se o tamanho de partícula variável entre 0,471 e 0,117 μm com percentual de 81 e 19%, respectivamente. Para melhor interpretação, a partir deste ponto os valores apresentados em parênteses, assim como percentual, se referirão a distribuição do volume de partículas nesta faixa. Ao se ajustar o pH para valores de 9, 7 e 2, verificou-se alterações em relação ao tamanho e o percentual distribuição. A amostra de pH 9 obteve um tamanho máximo de partícula de 0,472 (60%), 0,934 (32%) e 0,0189 μm (8%), valores que coincidem com o maior valor de tamanho para a amostra A em pH 10, divergindo somente pelo fato de ocorrer diminuição do percentual no maior tamanho e aumento no valor intermediário, além de aparecimento de uma pequena porção de amostras em tamanho de 0,0189 μm . A amostra em pH 7 passou a ter o seu tamanho máximo de partícula diminuído em valores de 0,381 μm (68%), mas nesse caso ocorreu diminuição ainda maior do valor intermediário em relação às amostras A e A9, com tamanhos neste caso de 0,040 μm (26%). Em relação ao pH ácido em 2, a amostra A2 apresentou tamanho máximo de partícula semelhante a A7, com valor de 0,400 μm , porém diminuiu o percentual comparado a A7, chegando em 55,9% neste caso, além do que ocorreu a formação de agregados volumosos com tamanho de 1,477 μm (12,4%), que não foram observados nas demais amostras.

Portanto, foi observado que o tamanho de partícula foi $A > A9 > A2 > A7$, e que em todos os casos com pH ajustado ocorreu uma possível modificação da proteína, visto a diminuição da frequência do valor máximo. Considerando que ao se ajustar o pH das soluções com HCl, adicionam-se íons oriundos da solução que podem propiciar modificações na estrutura da proteína. A solução em pH 9,0 encontrar-se mais distante do seu ponto isoelétrico (pI de 5,3, teórico) e, portanto, mais negativamente carregada, o que leva a um aumento da repulsão eletrostática intramolecular que acarretaria em uma dificuldade de agregação. A diminuição de

tamanho em relação ao pH 10,0 deu-se provavelmente pela influência dos íons da solução de HCl, resultando em desdobramento estrutural ou dissociação das subunidades das proteínas^{122,123}, o que corrobora com os resultados polidispersos observados.

Nesse trabalho, pode-se observar que ocorreu diminuição do tamanho da partícula de albumina para em pH 9,0, visto o menor percentual de partículas em tamanho de aproximadamente 0,470 μm em relação à proteína sem ajuste (60% e 81%, respectivamente). Com aproximação dos valores de pH para 7,0, relativamente mais próximo aos valores do pI da proteína (5,3), verificou-se diminuição do tamanho máximo de partícula no pico 1 chegando a 0,381 μm (68%), inferindo então que com o a adição de íons H^+ e Cl^- esteja ocorrendo certa dissociação das subunidades da albumina e mudança estrutural da superfície proteica. No pH 2,0, a proteína encontra-se menos negativamente carregada em relação à demais, com pZ de -1,4, comparado a -26,2, -10,5 e -26,2 mV para A, A9 e A7, respectivamente. Mais uma vez é observado a diminuição da intensidade do maior pico de distribuição da proteína, indicando que está ocorrendo uma dissociação das subunidades da mesma, fazendo com que ocorra diminuição da distribuição do tamanho de partículas e nesse caso até mesmo uma possível desnaturação. As possíveis ocorrências estruturais são apresentadas na Figura 18. Observou-se um percentual considerável de 12% de partículas com tamanho de 1,477 μm , isto deve-se pelo potencial zeta estar próximo de 0 (-1,4 mV), indicando a presença de aglomerados. Os valores de PDI seguiram que $A2 > A9 > A7 > A$, indicando que amostras sem adição de íons (H^+ e Cl^-) apresentaram menor polidispersão e maior estabilidade. Em compensação com a diminuição do pH e a aproximação do valor de pH com o pI (5,3), foram observadas amostras mais dispersas entre si.

Tabela 2. Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta da proteína albumina em diferentes pH.

Amostra	Pico 1 (d.µm)	Pico 2 (d. µm)	Pico 3 (d. µm)	PDI	Pot. Zeta (mV)	pH
A	0,471 (81%)	0,117 (19%)	-	0,507	-26,2	9,99
A9	0,472 (60%)	0,093 (32%)	0,019 (8%)	0,610	-10,5	9,05
A7	0,381 (68%)	0,040 (26%)	0,013 (6%)	0,561	-6,2	7,11
A2	0,400 (56%)	0,070 (15%)	1,477 (12%)	0,950	-1,4	2,11

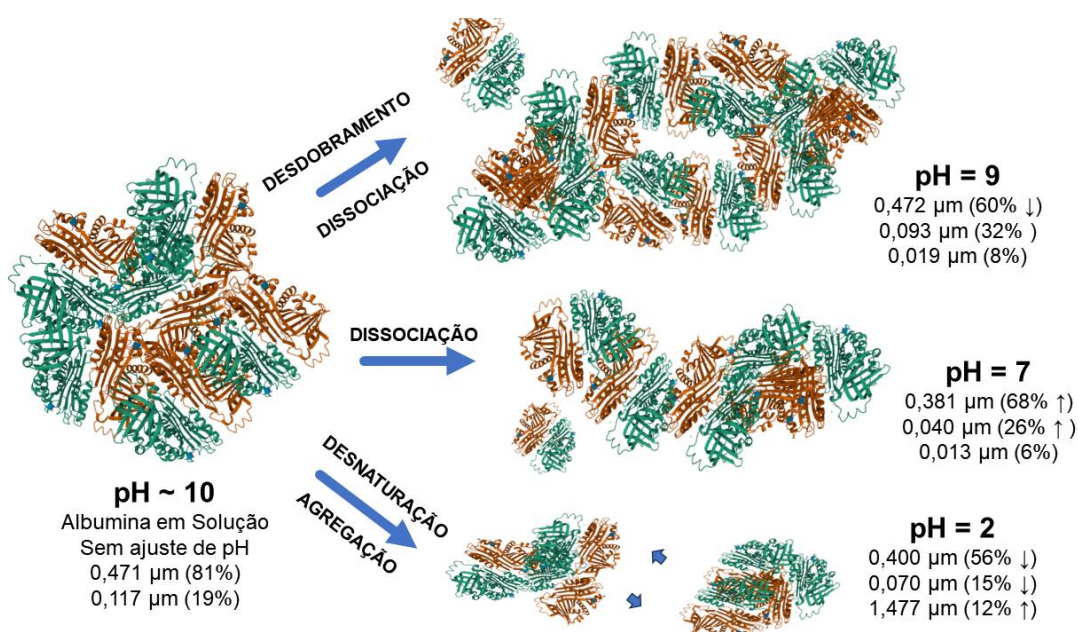


Figura 18. Hipóteses de mudanças conformacionais da albumina em diferentes pH. Uma unidade de proteína é representada por cada conjunto verde/laranja. As setas ao lado do percentual indicam a variação em relação à proteína em pH 10.

No caso da caseína (Tabela 3) são observados resultados semelhantes aos da albumina. Porém, neste caso, o que se pode prever é que provavelmente estejam ocorrendo mudanças na estrutura micelar, ao contrário do aglomerado de proteínas

da albumina. As caseínas constituem cerca de 75-80% da proteína total e precipitam em pH 4,6 a 30 °C. As micelas de caseína são compostas por numerosas unidades compactadas do complexo de caseinato de cálcio, unidas em associação por uma combinação de cálcio e ligações de fosfato de cálcio e citrato entre caseína fosfoserina e grupos carboxila. A ligação hidrofóbica e as pontes de caseinato de cálcio estabilizam a micela, enquanto o fosfato de cálcio ajuda a agregar as submicelas em estruturas micelares¹²⁴. Cada uma dessas unidades do complexo de caseinato de cálcio é composta por um núcleo constituído por α S1 e β -caseína, rodeado por uma camada externa rica em α S1 e k-caseína a qual interage com a água.

A solução de caseína sem ajuste de pH apresenta um valor igual a 6,8, ao elevar o pH para 9,0, verificou-se uma diminuição do tamanho e uma distribuição mais uniforme da micela de caseína de 0,319 μ m (94%) para 0,200 μ m (100%). Isto deve-se provavelmente a uma desagregação das micelas da proteína ou então a uma compactação da mesma, devido ao aumento da repulsão entre partículas, fazendo com que as micelas diminuam de tamanho ¹²⁵. Já no pH 7,0, próximo ao pH encontrado para a proteína em solução, pode-se observar uma diminuição do tamanho majoritário de partículas para 0,256 μ m (96,9%), porém, também se observou que apesar de ter ocorrido uma diminuição da porcentagem de partículas com tamanho acima de 5 μ m, houve um aumento de 5,1 para 5,2 μ m.

O valor de tamanho de partícula elevado para a amostra C, muito provavelmente se dá pela diminuição de cargas superficiais e relaxamento da estrutura, devido à ausência de íons oriundos do HCl e NaOH utilizados quando do ajuste de pH e que podem estar interferindo na carga estrutural da proteína. Neste caso, ensaios mais próximos ao pI da proteína são recomendados para melhor elucidação dos fatos. Com exceção da amostra C9, todas as demais apresentaram pico com intensidade baixa na faixa aproximada de 5,2 μ m, oriundo de agregados grandes de proteína. Além disso, pode-se observar que a solução contendo a caseína sem ajuste do pH (pH 6,8) apresentou maior estabilidade que as demais, corroborando uma possível influência dos íons das soluções de NaOH e HCl levando à uma diminuição da estabilidade das micelas. O aumento da adição de meio alcalinizante tende a ainda maior diminuição deste potencial (de -22,9 para -10,9). Em pH 2, a

proteína apresenta tamanho menor às demais condições, isso implica possivelmente em uma dissociação das micelas ou colapso da camada externa⁹⁴, devido à presença de grande quantidade de íons provenientes do HCl utilizado para acidificar o meio e que interagem com a superfície proteica formando carga interações repulsivas e dissociativas. Um esquema demonstrando um breve resumo das possíveis modificações nos pHs avaliados é demonstrado a seguir (Figura 19).

Tabela 3. Tamanho médio, distribuição de tamanho e potencial zeta da proteína caseína em diferentes pH.

Amostra	Pico 1 (d. μm)	Pico 2 (d. μm)	Pico 3 (d. μm)	PDI	Pot. Zeta (mV)	pH
C	0,318 (94%)	5,131 (6%)		0,523	-22,9	6,84
C2	0,136 (97%)	5,227 (3%)		0,424	-0,9	2,07
C7	0,256 (97%)	5,243 (3%)		0,350	-13	7,01
C9	0,200 (100%)			0,258	-10,9	8,99

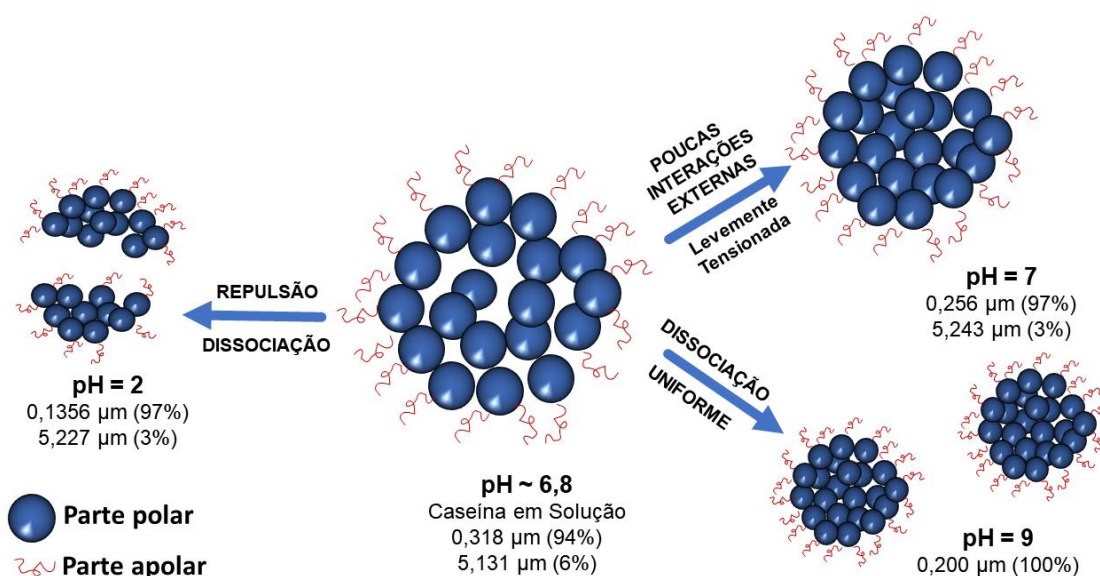


Figura 19. Hipóteses de mudanças estruturais das micelas de caseína em diferentes valores de pH.

A formação de possíveis particulados nas soluções de FeCl₃ e ZnCl₂ sem as proteínas a partir da adição de NaOH no ajuste do pH para 9, no caso dos íons de ferro, e 7 para os de zinco, foi avaliada. Em relação às partículas de ferro (Tabela 4), pode-se observar elevado tamanho destes sistemas, considerando d(0,9) com valores de entre 2,000 e 7,000 µm. Isto deve-se, muito provavelmente, pela formação de agregados de hidróxidos metálicos, assim como alta taxa de hidratação e formação de coloides.

Tabela 4. A. Diâmetro hidrodinâmico das partículas e distribuição, pH, Span e potencial zeta das soluções de FeCl₃, sem as proteínas, em pH 9*.

Amostra	d(0.1) (d. µm)	d(0.5) (d. µm)	d(0.9) (d. µm)	Span	Potencial Zeta (mV)	pH
Fe5	0,084	0,182	2,309	12,21	-4,39	9,10
Fe10	0,088	0,239	5,094	20,91	-9,12	8,80
Fe25	0,073	0,160	4,105	25,27	-5,35	9,03
Fe35	0,084	0,206	5,502	26,29	-5,4	8,98
Fe50	0,077	0,184	6,671	35,84	-5,96	8,88
Fe75	0,080	0,205	5,765	27,78	-9,19	9,21
Fe150	0,076	0,175	5,949	33,55	-6,89	8,82
Fe300	0,078	0,183	4,588	24,60	-8,36	8,92
Fe400	0,076	0,171	4,666	26,85	-10,6	9,22
Fe700	0,083	0,209	4,196	19,69	-4,87	8,94

*Amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000.

As partículas provenientes da solução de ZnCl₂ (Tabela 5) apresentaram tamanho relativamente menor comparado as partículas de ferro. A distribuição de até 90% das partículas em todas as amostras não foi maior do que 2,000 µm, sendo que as partículas de ferro chegaram a valores de até 6,671 µm. Isto pode ser pelo fato de o ajuste ter sido até o pH 7 e não 9 como no caso do ferro, sendo assim, a quantidade de íons OH⁻ consequente foi menor formando menores concentrações de hidróxidos metálicos.

Tabela 5. Diâmetro hidrodinâmico das partículas e distribuição, pH, Span e potencial zeta das soluções de ZnCl₂, sem as proteínas, em pH 7*.

Amostra	d(0.1) (d. µm)	d(0.5) (d. µm)	d(0.9) (d. µm)	Span	Potencial Zeta (mV)	pH
Zn5	96	229	728	31,3	-1,19	6,95
Zn10	82	182	605	38,7	-2,57	6,98
Zn25	68	147	1375	45,5	-2,7	6,95
Zn35	68	150	1725	44,7	-0,622	6,95
Zn50	71	156	1002	43,7	-0,431	6,96
Zn75	72	159	865	43,7	-1,6	7,00
Zn150	77	174	909	40	2,68	6,95
Zn300	89	220	1084	32,7	5,64	7,10
Zn400	97	235	981	30,3	6,41	7,03
Zn700	85	195	892	35,8	6,66	6,99

*Amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000.

Após estas observações, se faz necessário a avaliação do tamanho e estabilidade das partículas metal-proteína. A primeira a ser analisada são as partículas oriundas da mistura de albumina com FeCl₃, sem ajuste de pH (pH final entre 4 e 1) e com ajuste de pH (pH9) (Tabela 6).

As amostras contendo albumina e íons de ferro nas concentrações de 5 a 150 mM, sem ajuste de pH (AFe5, AFe10, AFe25, AFe35, AFe75 e AFe150) apresentaram tamanho de partículas na faixa de 0,186 a 0,337 µm, em relação a maior intensidade percentual. Amostras de tamanhos menores entre 0,030 e 0,102 µm também são observadas, com percentuais relativamente inferiores. Todas as amostras apresentaram pH em torno de 2, com exceção da amostra menos concentrada AFe5 (pH 4,45). Esse tamanho de partícula (0,186-0,337 µm), comparado com o tamanho máximo de pico encontrado para a amostra contendo somente a proteína em pH 2 (0,400 µm), indica que ocorreu diminuição do tamanho médio das partículas com a adição do metal. Isto pode indicar mudança conformacional que levou a uma compactação ou dissociação devido a variação da carga superficial da proteína pela

possível interação com os íons de Fe^{3+} (Figura 20). As amostras AFe50 e AFe700 apresentaram tamanho elevado de partícula, com tamanhos em torno de 4,000 μm .

Tabela 6. Tamanhos de partículas, pH, Pdl e potencial zeta das amostras de albumina com metal ferro, sem e com ajuste de pH.

Amostra (pH)	Pico 1 (d. μm) ou d(0.9)	Pico 2 (d. μm) ou d(0.5)	Pico 3 (d. μm) ou d(0.1)	Pdl ^a ou Span ^b	Potencial Zeta (mV)	pH
A	0,471 (81%)	0,117 (19%)		0,507 ^a	-26,2	9,99
A2	0,400 (56%)	0,070 (15%)	1,477 (12%)	0,950 ^a	-1,4	2,11
A9	0,472 (60%)	0,093 (32%)	0,019 (8%)	0,610 ^a	-10,5	9,05
AFe5	0,187 (89%)	0,030 (7%)	5,056 (4%)	0,414 ^a	11,1	4,45
AFe10	0,337 (51%)	0,102 (39%)	0,019 (8%)	0,452 ^a	27,7	2,79
AFe25	0,234 (85%)	0,011 (8%)	5,192 (5%)	0,692 ^a	28,0	2,11
AFe35	0,239 (55%)	0,078 (32%)	0,014 (13%)	0,354 ^a	29,9	2,04
AFe50	4,702 (60%)	0,485 (40%)		1,000 ^a	28,6	2,04
AFe75	0,197 (64%)	0,041 (17%)		0,622 ^a	28,2	1,71
AFe150	0,223 (77%)	0,067 (33%)		1,000 ^a	29,6	1,80
AFe300	10,800 (100%)			0,244 ^a	29,8	1,51
AFe400	2,745 (100%)			0,287 ^a	20,0	1,36
AFe700	4,154 (100%)			0,225 ^a	25,1	1,14
AFe5_9	2,239	0,138	0,068	15,716 ^b	-14,5	9,12
AFe10_9	2,096	0,132	0,067	15,317 ^b	-18,6	9,05
AFe25_9	2,291	0,136	0,068	16,343 ^b	-24	9,02
AFe35_9	2,214	0,154	0,072	13,934 ^b	-30,5	8,96
AFe50_9	4,255	0,190	0,0078	21,996 ^b	-18,9	8,12
AFe75_9	4,592	0,241	0,084	18,686 ^b	*	9,04
AFe150_9	3,486	0,185	0,078	18,443 ^b	*	9,06
AFe300_9	4,378	0,206	0,081	20,863 ^b	*	9,10
AFe400_9	3,362	0,171	0,076	19,241 ^b	*	9,01
AFe700_9	3,509	0,184	0,079	18,674 ^b	*	9,04

(a) Amostras medidas em equipamento Zetasizer Nano-ZS® (b) amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000. *Não foi realizada medida nesta condição.

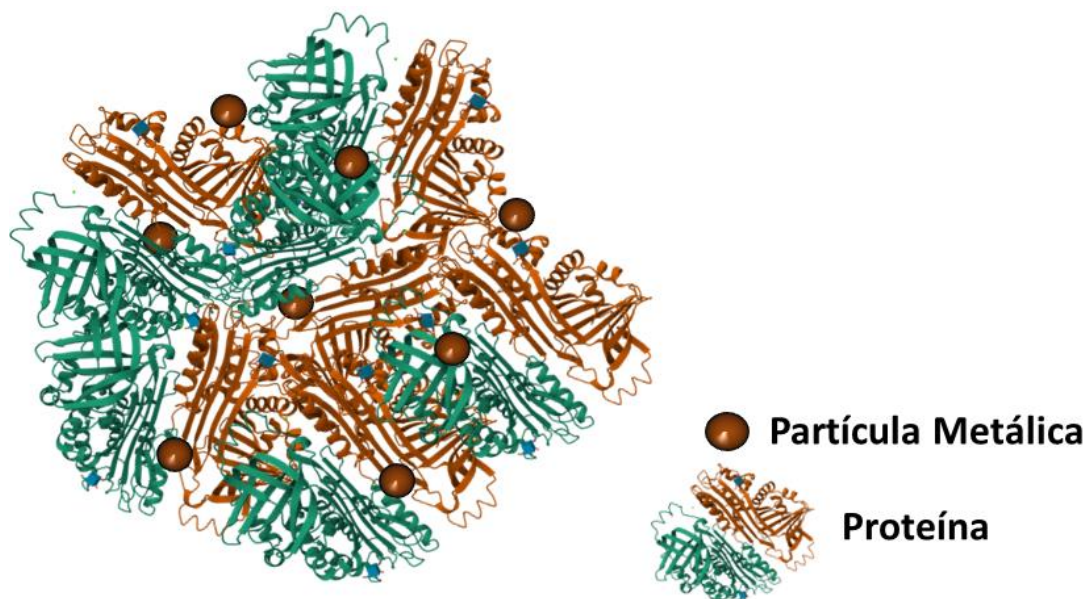


Figura 20. Hipótese de interação dos íons ferro com albumina, na síntese sem ajuste de pH.

Ainda sobre as amostras sem ajuste de pH, as amostras AFe300, AFe400 e AFe700 apresentaram tamanhos mais elevados, de 10,800 μm , 2,745 μm e 4,154 μm . Esse aumento significativo dos tamanhos das partículas na amostra se deve muito provavelmente a agregação da proteína devido ao baixo pH do meio, fazendo com que a camada externa da proteína colapse e se agregue em partículas maiores, ou então ao fato que o metal em excesso pode estar formando uma camada de hidratação no exterior da proteína, fazendo com que seu tamanho hidrodinâmico seja mais elevado, vide a grande interação do Fe^{3+} com água (Figura 21). Em relação ao potencial zeta, pode-se observar que as partículas apresentaram valores positivos e mais elevados nas concentrações de 10 a 300 mM (27,7 a 29,8 mV), muito provavelmente devido a carga positiva exercida pelo íon Fe^{3+} na camada externa da proteína (Figura 21). A medida do índice de polidispersão (PDI) pode evidenciar que as amostras apresentaram alta polidispersividade, com valores maiores que 0,6 na maioria dos ensaios, devido provavelmente a diferentes formas e tamanhos de agregados proteicos, sendo que valores mais próximos de 0 indicam uma baixa polidispersividade, enquanto valores próximos de 1 indicam polidispersividade,

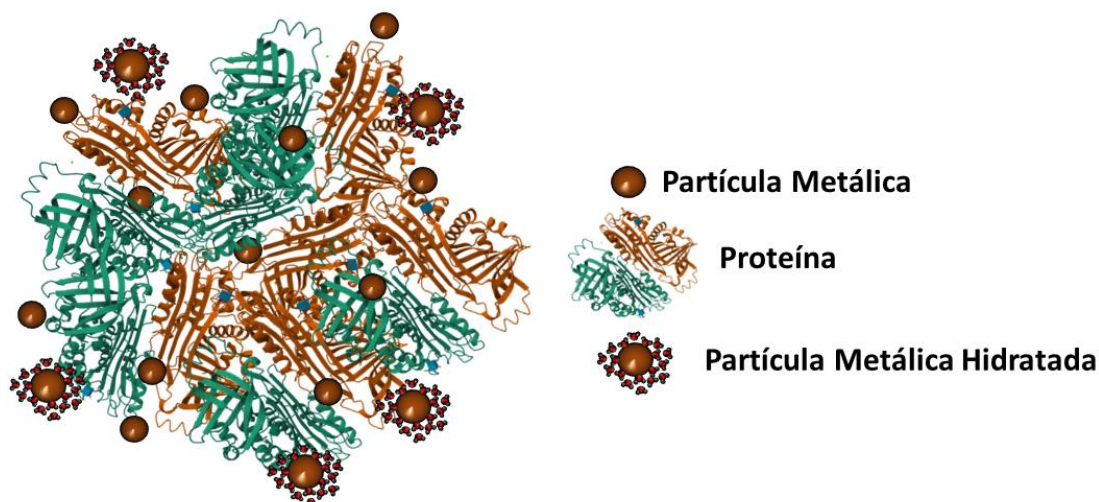


Figura 21. Hipótese de interação dos íons ferro com albumina na síntese sem ajuste de pH, quando do aumento observado no tamanho de partícula devido a hidratação destes íons.

Nas partículas sintetizadas com albumina e íons ferro ajustando-se o pH em 9 (Tabela 7), as amostras iniciais apresentaram aumento significativo de tamanho em relação às amostras com mesma concentração sem ajuste de pH. Por exemplo, a amostra AFe5 apresentou tamanho máximo de partícula de 0,187 μm (88,5%), já a amostras AFe5_9 apresentou tamanho de 2,239 μm considerando 90% das partículas ($d[0,9]$). A partir da amostra AFe35_9, foi possível observar ainda maior aumento da partícula, chegando a partículas entre 3,362 (AFe400_9) e 4,378 μm (AFe300_9). Este aumento significativo no tamanho das partículas se deve muito provavelmente ao aumento da camada externa de solvatação proveniente da interação dos metais com o íon OH^- , proveniente da alcalinização do meio. Estes hidróxidos metálicos situados na camada externa fazem com que o tamanho observado seja cada vez maior.

Em relação ao potencial zeta, as amostras sem ajuste de pH apresentaram valores na faixa de 11,1 (AFe5) a 29,9 mV (AFe35), indicando que o íon metálico pode estar interferindo na carga do sistema devido ao seu potencial positivo. Nas amostras com ajuste de pH, foram observados valores de potencial zeta negativo (entre -14,5 e -30,5 mV), indicando que neste caso há a presença de grupamentos OH^- provenientes da base e que estão presentes na superfície da partícula. Assim como, pode estar ocorrendo a formação de hidróxidos metálicos que estejam promovendo a diminuição da carga superficial. As concentrações maiores para com o ajuste de pH não puderam

ser medidas devido à alta taxa de oxidação do metal presente na cubeta do equipamento.

Outro fato que merece ser apreciado é o de que, comparando-se o tamanho das soluções de FeCl_3 sem proteína, alcalinizadas em pH 9 (Tabela 4), as mesmas apresentaram tamanhos de partícula relativamente superiores aos da proteína com o metal. Isto pode ser pelo íon Fe^{3+} em pH ajustado a 9 estar circundado por porções de íons OH^- e por sua vez com sua superfície solvatada, fazendo com que seu tamanho seja elevado (Figura 22). Quando interagindo com a proteína, provavelmente pelo fato de o metal adentrar na sua estrutura, mudanças conformacionais podem estar ocorrendo, desde perda da hidratação superficial, diminuição do seu tamanho de partículas devido a interações com a proteína ou até mesmo redução do centro metálico.

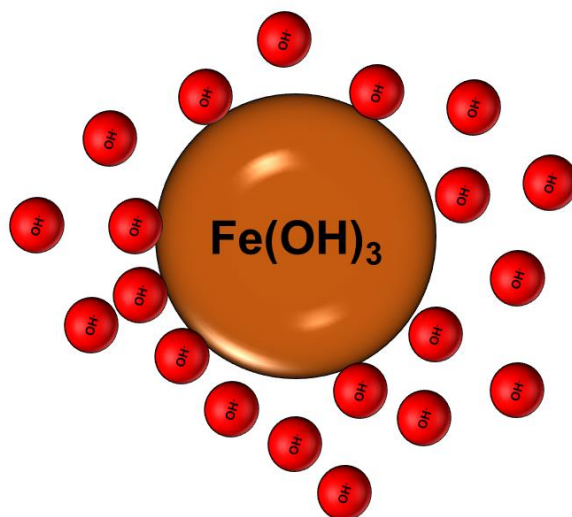


Figura 22. Suposição da hidratação do hidróxido de ferro formado em pH alcalino.

As partículas sintetizadas com albumina e ZnCl_2 em diferentes concentrações, apresentaram diferença significativas entre si (Tabela 7). As amostras menos concentradas sem ajuste de pH, AZn5, AZn10 e AZn25, apresentaram tamanhos de 0,270 μm (56%), 0,433 μm (55%) e 0,250 μm (82%), respectivamente. Comparados aos valores de tamanho em pH mais próximo da proteína sem metal (amostra A7), em que o tamanho foi de 0,381 μm (68%), pode-se concluir que as amostras AZn5 e

AZn25 apresentaram tamanho inferior ao encontrado para a albumina nesta condição. Isso se deve muito provavelmente a uma dissociação da estrutura da proteína devido a interação do zinco, fazendo com que a estrutura colapse, dissociando e formando estruturas menores ou mais compactas.

Com o sequencial aumento da concentração de zinco, observa-se aumento do tamanho de partícula, o que é esperado, visto o aumento de metal interagindo com a proteína. O potencial zeta das amostras também diminuiu com o aumento da concentração de zinco, indo de -15,3 mV para a amostra AFe5 até -3,17 mV para a amostra AZn700. Essa diminuição do potencial zeta pode estar relacionada com a presença de cargas positivas oriundas do íon Zn^{2+} na superfície da partícula, fazendo assim com que seja observado um potencial inferior nas concentrações maiores.

Em relação as amostras com o pH ajustado em 7, ocorreu aumento significativo de tamanho das amostras, com valores da ordem de 450 a 800 μm , chegando na faixa de centenas de micrômetros. A justificativa para isto se dá muito provavelmente pela formação de agregados de $Zn(OH)_2$ na superfície da proteína, fazendo com que seja observado um diâmetro hidrodinâmico elevado nestas amostras, visto que a interação entre a água e os grupamentos OH^- nesta superfície pode ser extremamente elevada, fato semelhante ao da Figura 21, porém com maior quantidade de íons circundando a parte externa dos aglomerados proteicos.

Tabela 7. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de albumina com metal zinco, sem e com ajuste de pH.

Amostra (pH)	Pico 1 (d. μm) ou d(0.9)	Pico 2 (d. μm) ou d(0.5)	Pico 3 (d. μm) ou d(0.1)	PDI ^a ou Span ^b	Potencial Zeta	pH
A	0,471 (81%)	0,117, (19%)		0,507 ^a	-26,2	9,99
A2	0,400 (56%)	0,070 (15%)	1,477 (12%)	0,950 ^a	-1,4	2,11
A7	0,381 (68%)	0,040 (26%)	0,013 (6%)	0,561 ^a	-26,2	7,11
AZn5	0,270 (56%)	0,839 (21%)	0,050 (23%)	0,749 ^a	-15,3	7,59
AZn10	0,433 (55%)	0,118 (39%)	0,030 (6%)	0,579 ^a	-15,1	7,14
AZn25	0,250 (82%)	0,064 (18%)		0,499 ^a	-10,2	6,89
AZn35	1,240 (82%)	0,133 (18%)		0,862 ^a	-9,45	6,78
AZn50	2,365 (100%)			0,012 ^a	-8,36	6,70
AZn75	3,350 (100%)			0,032 ^a	-7,2	6,58
AZn150	1,727 (77%)	5,408 (23%)		0,353 ^a	-5,78	6,29
AZn300	5,830 (100%)			0,529 ^a	-4,4	5,98
AZn400	6,188 (100%)			0,370 ^a	-3,41	5,80
AZn700	2,308 (80%)	5,410 (20%)		0,315 ^a	-3,17	5,29
AZn5_7	489,906	286,688	4,027	1,679 ^b	-16,1	7,01
AZn10_7	526,056	52,39	3,153	8,614 ^b	-12,3	6,94
AZn25_7	532,757	317	3,031	1,734 ^b	-12,1	7,08
AZn35_7	842,493	345	5,151	7,361 ^b	-13,8	6,91
AZn50_7	531,191	71,688	4,384	8,062 ^b	-13,9	6,93
AZn75_7	533,021	79,637	4,679	3,067 ^b	-17,7	7,01
AZn150_7	496,439	20,998	5,229	22,91 ^b	-11,4	6,95
AZn300_7	*	*	*	*	*	*
AZn400_7	491,075	21,001	7,186	23,09 ^b	-7,52	7,15
AZn700_7	456,427	13,310	4,641	34,469 ^b	-6,45	7,21

(a) Amostras medidas em equipamento Zetasizer Nano-ZS® (b) amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000.

*Não foi realizada medida nesta condição.

Em relação à caseína, temos que levar em consideração que a estrutura da proteína muda em relação a albumina. Neste caso, tem-se a formação de micelas, como explicado no início deste tópico. Ao realizar ensaios com a adição de FeCl_3 sem e com o ajuste de pH (Tabela 8), podemos observar que as amostras sem ajuste de pH sofrem diminuição do pH já nas primeiras concentrações analisadas, chegando a pH 2 nas concentrações a partir de 10 mM. Além disso, com relação à menor concentração de metal adicionado à caseína sem ajuste de pH, observa-se um aumento significativo do tamanho em 1,268 nm, muito provavelmente, por algum efeito de agregação da proteína, visto que a quantidade de metal ainda é pequena para inferir um aumento tão significativo de tamanho. O tamanho diminui em relação à CFe5 em relação à CFe10 (0,532 μm), CFe 25 (0,995 μm), CFe35 (0,481 μm) e CFe50 (0,791 μm). Isto indica que, nessas concentrações, provavelmente a estrutura da proteína tende a dissociar e formar novos agregados menores, onde o metal encontra-se no seu interior e em alguns casos interagindo com a fase externa da proteína (Figura 23).

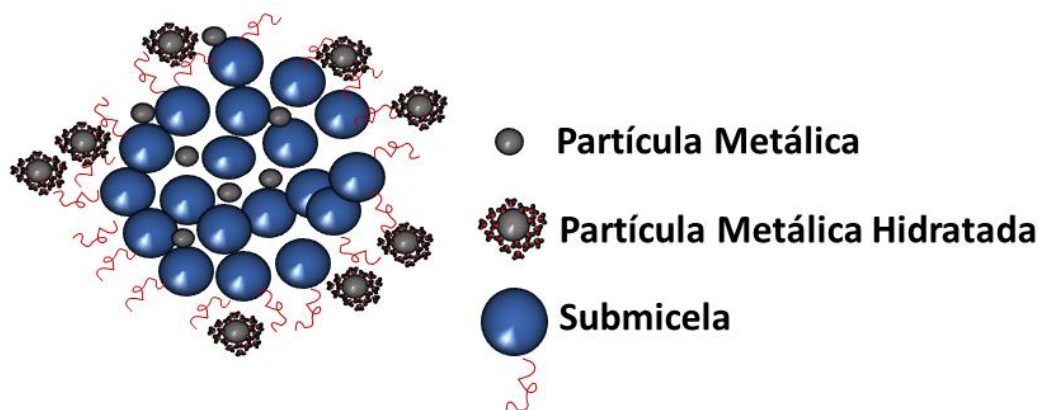


Figura 23. Hipótese de interação dos íons ferro com caseína na síntese sem ajuste de pH, quando da diminuição do tamanho observado devido a dissociação micelar e internalização dos íons metálicos.

Em concentrações superiores à 50 mM para as amostras sem ajuste de pH, foram observados tamanhos maiores, muito provavelmente devido ao excesso de íons

ferro em solução, os quais estão interagindo fortemente com a proteína na sua parede externa, fazendo com que seu tamanho hidrodinâmico aumente (Figura). O potencial zeta das amostras mostra uma mudança de carga de negativo para positivo, da amostra AFe5 para as demais, bem como, um aumento de valor, indicando que possivelmente os íons Fe^{3+} podem estar mais disponíveis na superfície, o que corrobora com o tamanho aumentado da partícula com o aumento da concentração. Os valores para algumas amostras, como é o caso de CFe25 com valor de potencial zeta de 35,8 mV, assim como valores elevados para CFe35 (34,7 mV), CFe75 (29,5 mV) e CFe300 (31,3 mV) são indicativos de uma estabilidade da partícula.

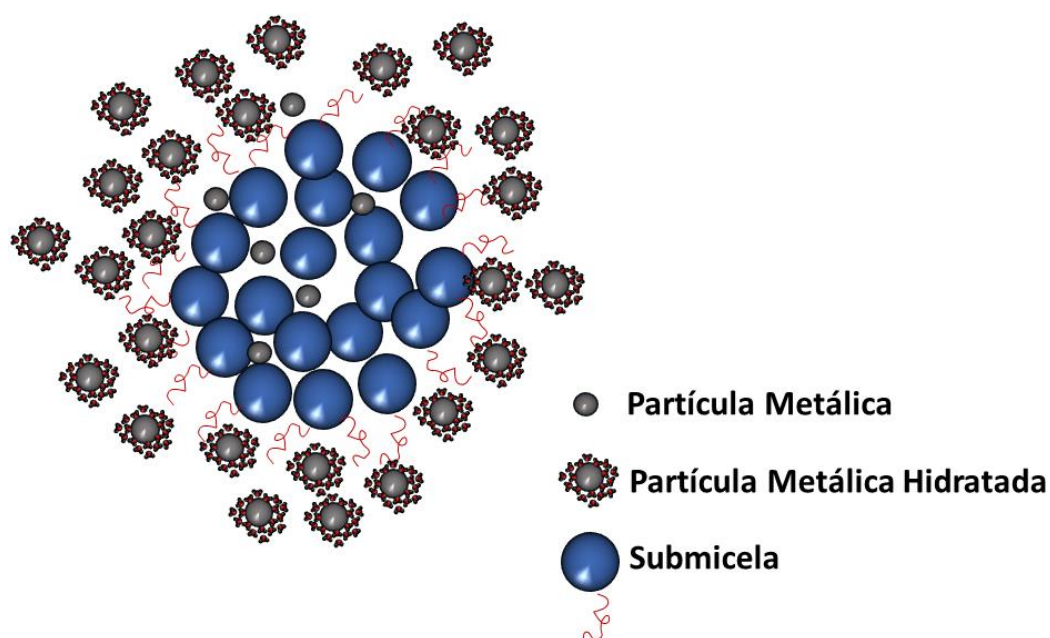


Figura 24. Hipótese 2 de conformação da caseína quando adicionado metal.

As amostras com o metal ferro no pH ajustado em 9 apresentaram tamanhos na faixa entre 2,651 e 37,650 μm para as concentrações avaliadas, com exceção das amostras CFe5_9 e CFe10_9 que apresentaram tamanhos de 0,723 e 1,720 μm , respectivamente. Acredita-se que nestas condições estejam sendo realizadas interações eletrostáticas fortes entre o metal com a superfície e mais relevantemente com o interior proteico. O tamanho e a polidispersividade não variaram significativamente para as amostras acima de 10 mM, indicando que o metal não afeta

significativamente as micelas de caseína com a adição do metal e do ajuste de pH em 9.

O potencial zeta para essas amostras mostraram uma tendência à redução das cargas negativas, saindo de valores de -20,4 mV para CFe5_9 para -10,7 mV para CFe50_9, indicando que muito provavelmente o íon Fe^{3+} esteja favorecendo a formação de cargas positivas na superfície. Para as amostras mais concentradas não foi possível a realização de medidas de potencial zeta, devido ao dano causado pelo metal na cubeta do equipamento. Portanto os ensaios em concentrações maiores foram interrompidos.

Tabela 8. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de caseína com metal ferro, sem e com ajuste de pH.

Amostra (pH)	Pico 1 (d. μm) ou d(0.9)	Pico 2 (d. μm) ou d(0.5)	Pico 3 (d. μm) ou d(0.1)	PDI ou Span	Potencial Zeta (mV)	pH
C	0,318 (94%)	5,131 (6%)		0,523 ^a	-22,9	6,84
C2	0,136 (97%)	5,227 (3%)		0,424 ^a	-0,9	2,07
C9	0,200 (100%)	0,200 (100%)		0,258 ^a	-10,9	8,99
CFe5	1,268 (100%)			0,424 ^a	-16,5	5,63
CFe10	0,532 (73%)	0,120 (27%)		0,743 ^a	26,7	4,04
CFe25	0,995 (66%)	0,230 (34%)		0,788 ^a	35,8	2,29
CFe35	0,481 (81%)	0,107 (19%)		0,961 ^a	34,7	2,16
CFe50	0,791 (100%)			0,510 ^a	28,8	2,06
CFe75	4,355 (68%)	0,251 (32%)		1,000 ^a	29,5	1,96
CFe150	1,530 (100%)			0,922 ^a	20,1	1,73
CFe300	0,396 (90%)	90,86 (10%)		0,401 ^a	31,3	1,49
CFe400	7,230 (100%)			0,048 ^a	20,1	1,36
CFe700	11,940 (100%)			0,141 ^a	12,9	1,12
CFe5_9	0,723	0,140	0,068	4,68 ^b	-20,4	9,08
CFe10_9	1,720	0,152	0,071	10,853 ^b	-21,9	8,94
CFe25_9	2,951	0,168	0,074	17,146 ^b	-21,7	9,10
CFe35_9	2,960	0,158	0,072	18,327 ^b	-15,4	9,08
CFe50_9	2,721	0,145	0,069	18,304 ^b	-10,7	8,99
CFe75_9	3,540	0,163	0,073	21,313 ^b	*	8,95
CFe150_9	3,765	0,170	0,075	21,708 ^b	*	9,13
CFe300_9	2,666	0,138	0,068	18,87 ^b	*	9,09
CFe400_9	3,158	0,156	0,072	19,781 ^b		9,02
CFe700_9	2,651	0,149	0,071	17,274 ^b	*	9,11

(a) Amostras medidas em equipamento Zetasizer Nano-ZS® (b) amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000. *Não foi realizada medida nesta condição.

As partículas de caseína com adição do metal zinco (Tabela 9) apresentaram diferenças significativas nas amostras sem ajuste de pH. As amostras entre 5 e 50 mM (CFe5-CFe50) apresentaram tamanhos de 2916, 3,676, 3,612, 2,476 e 3,542 μm , respectivamente. Já as amostras seguintes (CFe75-CFe700) apresentaram tamanhos entre 0,163 e 0,190 μm , com span baixo, indicando baixa polidispersão. Além disso, essas amostras apresentaram pH inferior a 5 e o potencial zeta mostrou uma tendência à redução das cargas negativas, de -11 mV para CFe50 e chegando a -8,3 mV em CFe75. O que explicaria esta mudança estrutural pode ser o mesmo encontrado para a caseína quando do pH ajustado em 2, onde observou-se diminuição do tamanho de partícula comparado aos demais valores de pH. Como justificado então, possivelmente esteja ocorrendo uma dissociação das micelas e formação de aglomerados de tamanho reduzido, devido provavelmente a grande quantidade de íons na superfície da caseína, fazendo com que ocorra repulsão e divisão micelar.

Ao ajustar o pH em 7, as amostras demonstraram aumento do tamanho de partículas, com valores em torno de 4,314-5,986 μm para as amostras CZn35_7 a CZn700_7, muito provavelmente pela formação de $\text{Zn}(\text{OH})_2$, o qual interage de certa forma com a estrutura da proteína, assim como ocorrido com a albumina em pH 7 com o mesmo metal. Desta forma então, é favorecida a formação de partículas maiores, seja por interação no interior da micela, fazendo com que ela seja expandida ou então formação de agregados na superfície, como já exemplificado pela Figura 24.

Tabela 9. Tamanhos de partículas, pH, PDI e potencial zeta das amostras de caseína com metal zinco, sem e com ajuste de pH.

Amostra (pH)	Pico 1 (d. µm) ou d(0.9)	Pico 2 (d. µm) ou d(0.5)	Pico 3 (d. µm) ou d(0.1)	PDI ou Span	Potencial Zeta	pH
C	0,318 (94%)	5,131 (6%)		0,523 ^a	-22,9	6,84
C2	0,136 (97%)	5,227 (3%)		0,424 ^a	-0,9	2,07
C7	0,256 (97%)	5,243 (3%)		0,350 ^a	-13	7,01
CZn5	2,916	0,198	0,078	14,296 ^b	-16,0	5,95
CZn10	3,676	0,327	0,091	10,951 ^b	-14,1	5,38
CZn25	3,612	0,343	0,097	10,246 ^b	-14,5	5,15
CZn35	2,476	0,299	0,093	7,961 ^b	-6,6	5,05
CZn50	3,542	0,418	0,104	8,232 ^b	-11	4,95
CZn75	0,190	0,111	0,061	1,169 ^b	-8,3	4,86
CZn150	0,168	0,110	0,073	0,862 ^b	-7,8	4,79
CZn300	0,168	0,111	0,073	0,863 ^b	-3,5	4,60
CZn400	0,163	0,110	0,075	0,799 ^b	-3,3	4,48
CZn700	0,190	0,110	0,061	1,170 ^b	-2,3	4,42
CZn5_7	54,151	408,045	1,259	1,324 ^b	-23,1	6,93
CZn10_7	50,568	394,257	1,026	1,280 ^b	-14,1	6,95
CZn25_7	10,563	23,750	4,877	10,209 ^b	-12,1	6,92
CZn35_7	50,336	11,312	4,531	44,099 ^b	-8,17	6,95
CZn50_7	48,632	10,803	4,314	44,618 ^b	-11,6	6,95
CZn75_7	44,114	13,969	5,549	31,184 ^b	-0,203	6,97
CZn150_7	47,605	20,862	4,808	22,588 ^b	12,7	6,97
CZn300_7	47,524	20,206	5,356	23,255 ^b	11,1	6,99
CZn400_7	63,715	18,617	5,986	3,101 ^b	8,16	7,10
CZn700_7	48,262	11,894	4,940	40,162 ^b	11,5	6,96

(a) Amostras medidas em equipamento Zetasizer Nano-ZS® (b) amostras medidas em equipamento Mastersizer 2000

Os ensaios, portanto, demonstraram mudanças significativas quando do ajuste de pH para as proteínas. A presença de íons como H^+ , Cl^- , OH^- podem ser cruciais na mudança estrutural das proteínas em solução. Em geral, valores de pH mais elevados fazem com que ocorra o aumento do tamanho das proteínas, devido a efeitos de dissociação e agregação. Em valores ácidos observa-se menor tamanho, causado provavelmente por maior efeito repulsivo, dissociativo ou de desnaturação. O efeito do metal frente a proteína pura foi diferente para cada proteína, metal e pH avaliado. Para amostras de albumina com adição de ferro e sem ajuste de pH, na maioria das concentrações, foram observadas partículas com volumes hidrodinâmico inferiores ao da proteína sem metal, muito provavelmente por efeitos dos íons Fe^{3+} na superfície da proteína, fazendo com que ocorram efeitos repulsivos no sistema. Para os ensaios com zinco sem ajuste de pH os volumes hidrodinâmicos encontrados para as partículas foram relativamente maiores ao da proteína em solução, muito provavelmente a formação de novos agregados e aumento da estrutura micelar, no caso da caseína, pela presença de íons Zn^{2+} no interior ou parte externa da proteína. Quando do ajuste de pH, é observado o aumento de volume, relacionado, provavelmente, ao efeito da existência de hidróxidos metálicos ($Fe(OH)_3$ e $Zn(OH)_2$), assim como de camada de hidratação na superfície da partícula.

6.3. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR

A espectroscopia FTIR é um método eficaz e rápido para a determinação da estrutura das proteínas. As proteínas são formadas por inúmeros tipos de ligações, como resíduos de aminoácidos e grupamentos orgânicos diversos. Visto isso, é importante avaliar mudanças conformacionais das proteínas nativas e das mesmas após a adição de reagentes que possam vir a alterar sua estrutura e ligação, como é o caso dos ensaios realizados neste trabalho.

Variações na intensidade e deslocamentos espectrais tanto para a banda amida primária da proteína (amida I), na faixa de $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ (estiramento $C=O$), quanto para a banda da amida secundária (amida II), que ocorre na região $<1548\text{ cm}^{-1}$ (estiramento $C-N$ acoplado com a flexão $N-H$), têm sido amplamente utilizadas na

interação com polifenóis e estão relacionadas com a estrutura secundária das proteínas¹²⁶. Além disso, outras bandas típicas podem ser úteis para avaliar a interação metal-proteína.

A seguir serão apresentados os gráficos referentes aos espectros obtidos para as soluções somente com proteína e também para as soluções contendo as partículas sintetizadas com os metais com e sem o ajuste de pH. Os espectros serão apresentados primeiramente de forma ampla e em seguida setorizados por intervalos de números de onda para melhor elucidação e observação das mudanças ocorridas.

6.3.1. Partículas de albumina e ferro sem ajuste de pH

Na amostra de albumina com ferro sem ajuste de pH (Figura 25) observou-se o aparecimento de bandas em 2970, 1593, 1557, 1367, 1092 e 540/525 cm^{-1} , assim como deslocamento da banda situada em 3270 cm^{-1} para 3469 cm^{-1} exclusivamente para AFe300.

A banda típica em 3270 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento dos grupos O-H ou N-H da proteína, e seu deslocamento pode inferir mudança conformacional destes grupos^{127,128}. Podemos observar que houve deslocamento positivo para a amostra AFe300. Neste caso, é típico que aminas secundárias apresentem estiramento nesta região, já aminas primárias aparecem em porções inferiores¹²⁹. Isto pode indicar principalmente que ocorra mudança conformacional da estrutura proteica, principalmente devido a algum tipo de desnaturação, fazendo que com que porções diferentes da proteína estejam dispostas para interação, visto que o pH está na faixa de 2,0 para amostras mais concentradas. A banda situada em 1593 cm^{-1} é típica da molécula de água^{130,131}, o que é apreciável, mesmo após a liofilização, visto que o precursor metálico é higroscópico e pode ter absorvido água do ambiente.

A banda situada em 1557 cm^{-1} é típica de amidas secundárias, que surge principalmente de uma combinação fora de fase das vibrações de flexão no plano N-H e estiramento C-N das ligações peptídicas¹³². Em 1395 cm^{-1} observa-se para a proteína, uma banda típica de grupamentos amino¹²⁹, e observa-se que esta banda desaparece com a adição do metal, o que pode indicar a interação metal-proteína pelos resíduos de aminoácidos, exceto para AFe300 onde ocorre deslocamento para

região de 1367 cm^{-1} . Para a proteína também se observa banda em 1311 cm^{-1} , indicativo de amida III ¹³³. A banda em 1092 cm^{-1} é típica de estiramento P-O ¹²⁷. Já na faixa próxima a 550 cm^{-1} observa-se ligeiro aparecimento de bandas, indicativos da ligação Metal-O ^{89,134,135}, como óxidos e hidróxidos de ferro ou zinco, neste caso ferro. Para a amostra AFe50 ocorreu aparecimento de banda em 992 cm^{-1} referente a ligação P-O ^{128,136}. Além disso, na faixa compreendida entre $1700\text{-}1500$ não houve mudanças significativas, o que indica que não houve mudança significativa da estrutura secundária da proteína com a adição do metal. ^{132,133,137,138}

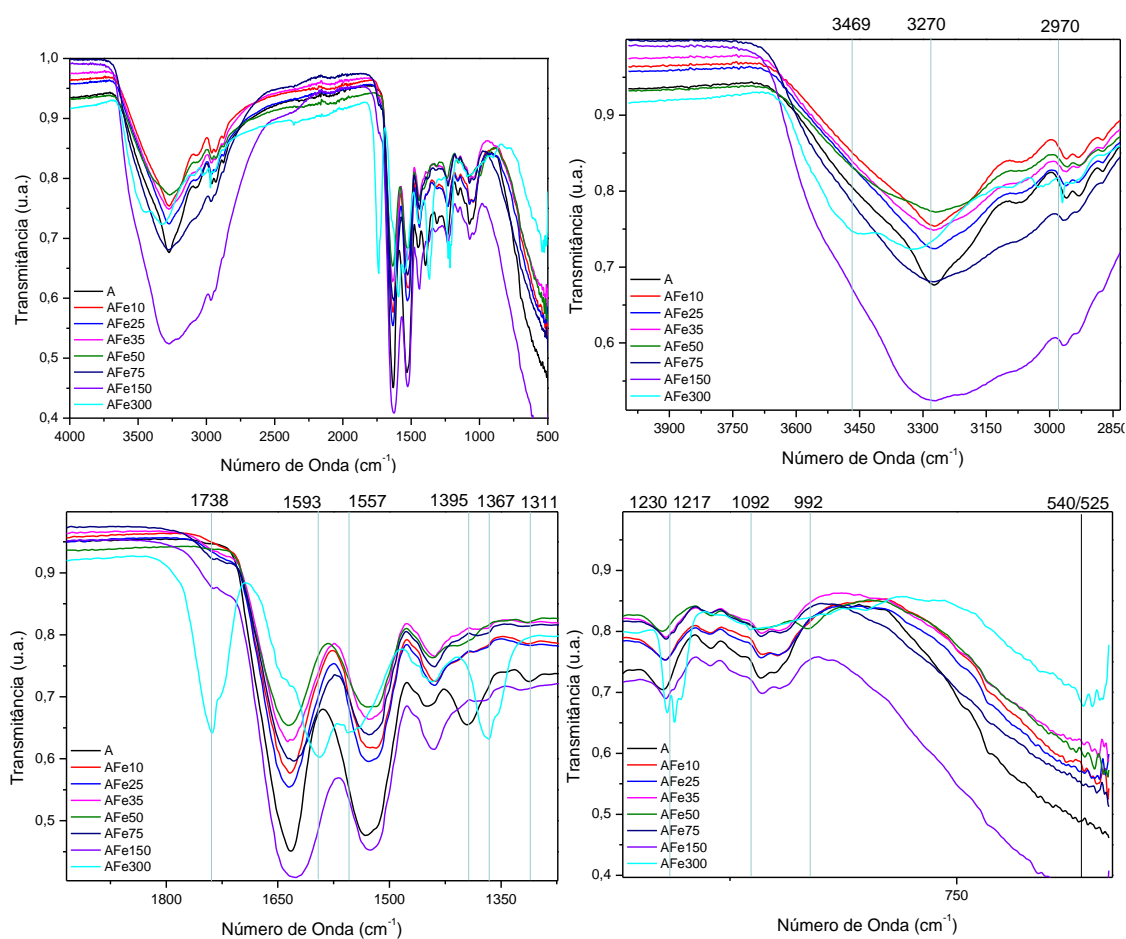


Figura 25. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e ferroa nas concentrações de 0 a 300 mM, sem ajuste do pH.

6.3.2. Albumina e ferro com ajuste de pH

Com o ajuste de pH para amostra de albumina com ferro (Figura 26), observou-se uma diminuição da intensidade das bandas em relação ao aumento de

concentração do metal nas bandas de 2960, 2930 e 2870, 1445, 1315, 1074 cm^{-1} . As bandas em 2960 e 2930 cm^{-1} são típicas da ligação C-H e de difícil interpretação em relação à mudança estrutural da proteína, visto sua complexidade. Já a banda situada próximo de 2870 cm^{-1} é típica de ligações C-H de aminas. Como relatado para as amostras de AFe, o estiramento em aproximadamente 1074 cm^{-1} se refere a ligação P-O. O inverso foi observado para a banda em 1740 cm^{-1} , típica de C=O, onde ocorreu ligeiro aumento de intensidade com o aumento da concentração.

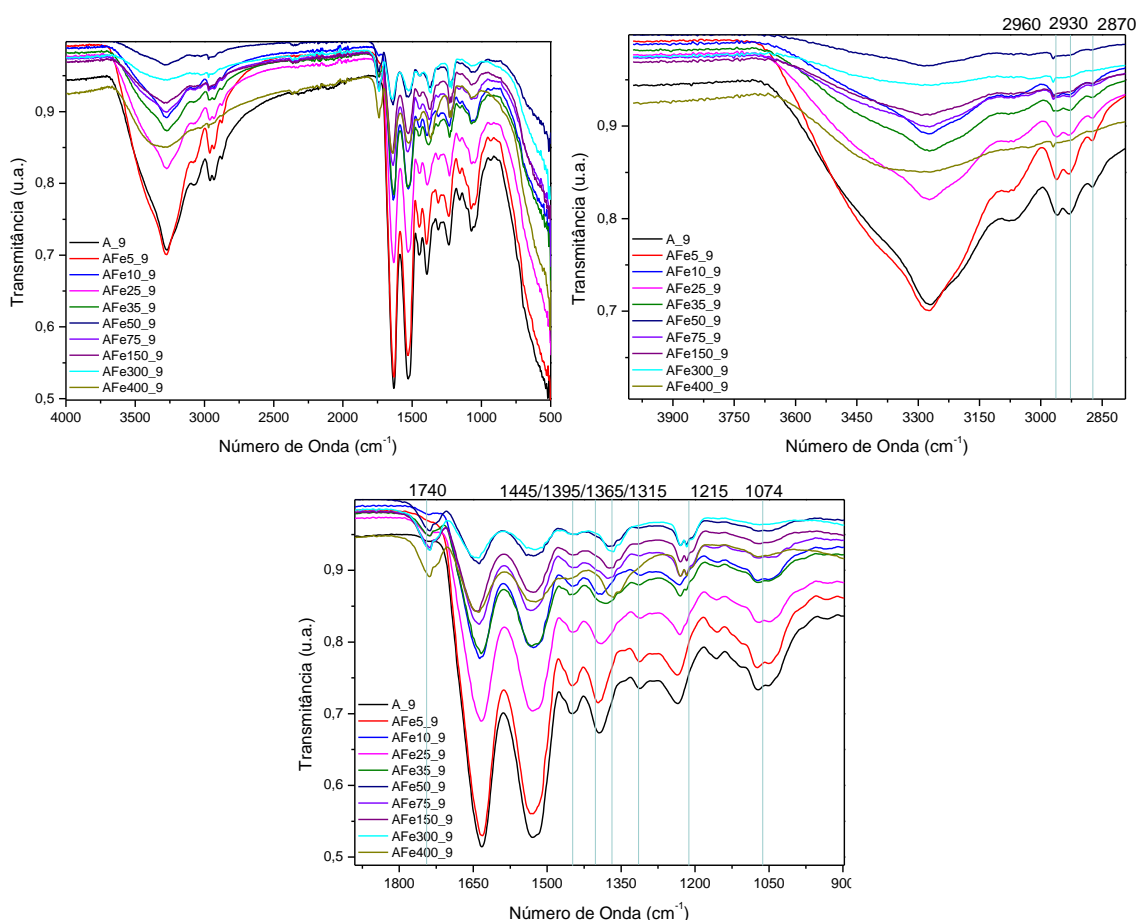


Figura 26. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e ferro nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH.

Ocorreu deslocamento das bandas de 1395 para 1365 cm^{-1} em maiores concentrações do metal. Esta região contempla as amidas terciárias, logo pode ser indicativo de interação metal-proteína por meio destes grupos, além disso, a faixa compreendida pelas demais amidas também diminui com o aumento da concentração

de metal, indicando interação metal-proteína.¹³⁶ Em aproximadamente 1230 cm^{-1} , a banda se desdobra em dois ombros, um permanece na mesma posição e surge novo em 1215 cm^{-1} , somente para maiores concentrações de ferro. Esta faixa é típica de O-H de porções aromáticas, logo pode ser inferido que esses grupos podem estar servindo de sítios de ligação para o metal.¹³⁹ Cabe destacar, ainda que a intensidade das amidas diminui com a concentração.

6.3.3. Albumina e zinco sem ajuste de pH

Para a amostra de albumina com zinco sem ajuste de pH (Figura 27) observou-se apenas uma banda em aproximadamente 1740 cm^{-1} , típico de ligações C=O para a amostra AFe75. As demais bandas não apresentaram mudanças quando se compara a proteína sem e com a adição de metal. Logo sugere-se que não houve interações significativas que pudessem ser observadas por essa técnica.

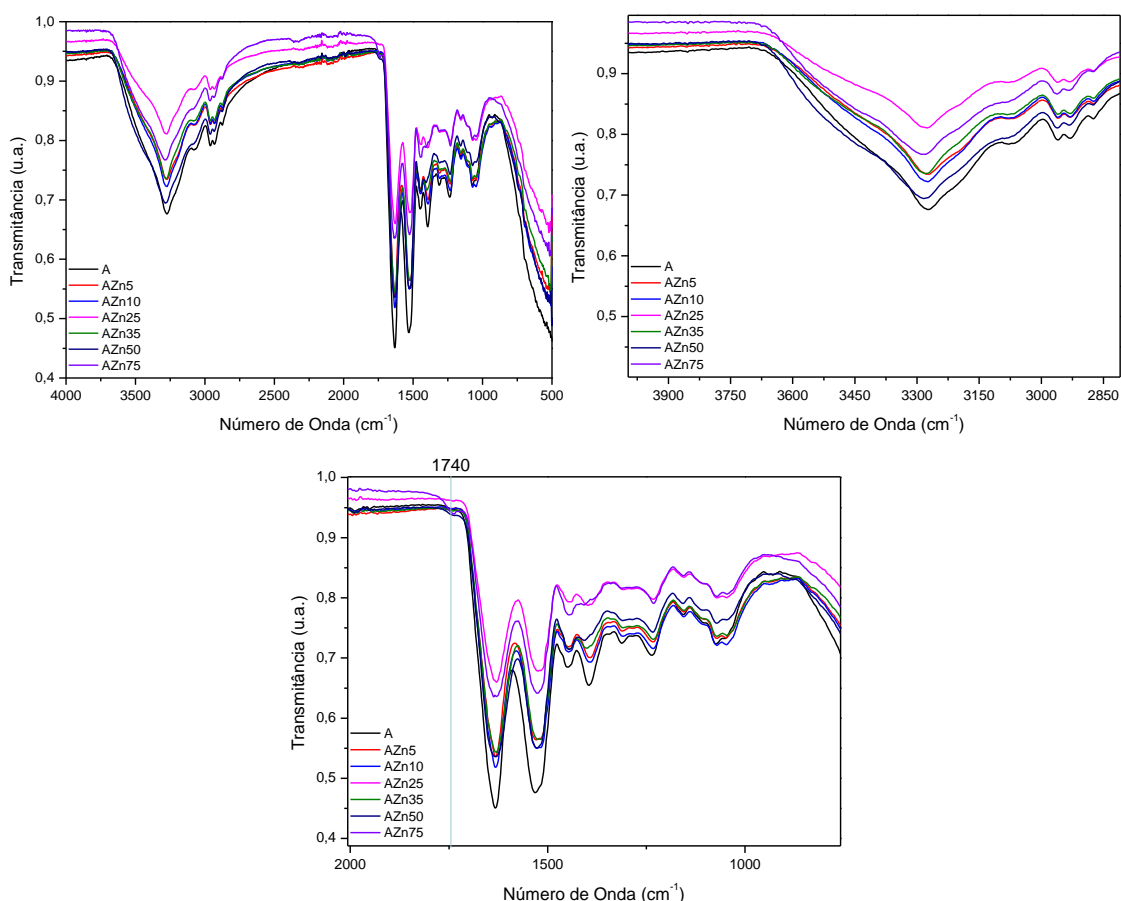


Figura 27. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e zinco nas concentrações de 0 a 75 mM, sem ajuste do pH.

6.3.4. Albumina e zinco com ajuste de pH

Ao realizar o ajuste de pH para a amostra de albumina e zinco (Figura 28) foram observadas bandas em 3500 e 3455 cm^{-1} para AZn400, típicos de moléculas de água. O pico em 3276 atribuída ao estiramento dos grupos O-H ou N-H da proteína diminui com o aumento da concentração do zinco, o que pode indicar maior interação com o metal ou então mudança estrutural pelo pH alcalino avaliado. As bandas em 2961, 2930 e 2873, 1395, 1310, 1155, 1073 cm^{-1} diminuem com o aumento da concentração, como foi observado anteriormente para os ensaios de AFe_9. As mesmas observações de AFe_9 para a banda de 1740 cm^{-1} , ou seja, com o aumento da concentração de metal ocorre aumento da intensidade. Ocorre também o deslocamento de 1370 para 1360 cm^{-1} , diferindo em algumas unidades de AFe_9, isto pode indicar que devido a variação de pH outras amidas ou então outras formas de ligação entre os grupos amida e o metal podem estar ocorrendo. Em 715 cm^{-1} observa-se uma banda somente para a amostra AZn400_7, o que indica a formação de hidróxido de zinco Zn(OH)_2 ¹³¹.

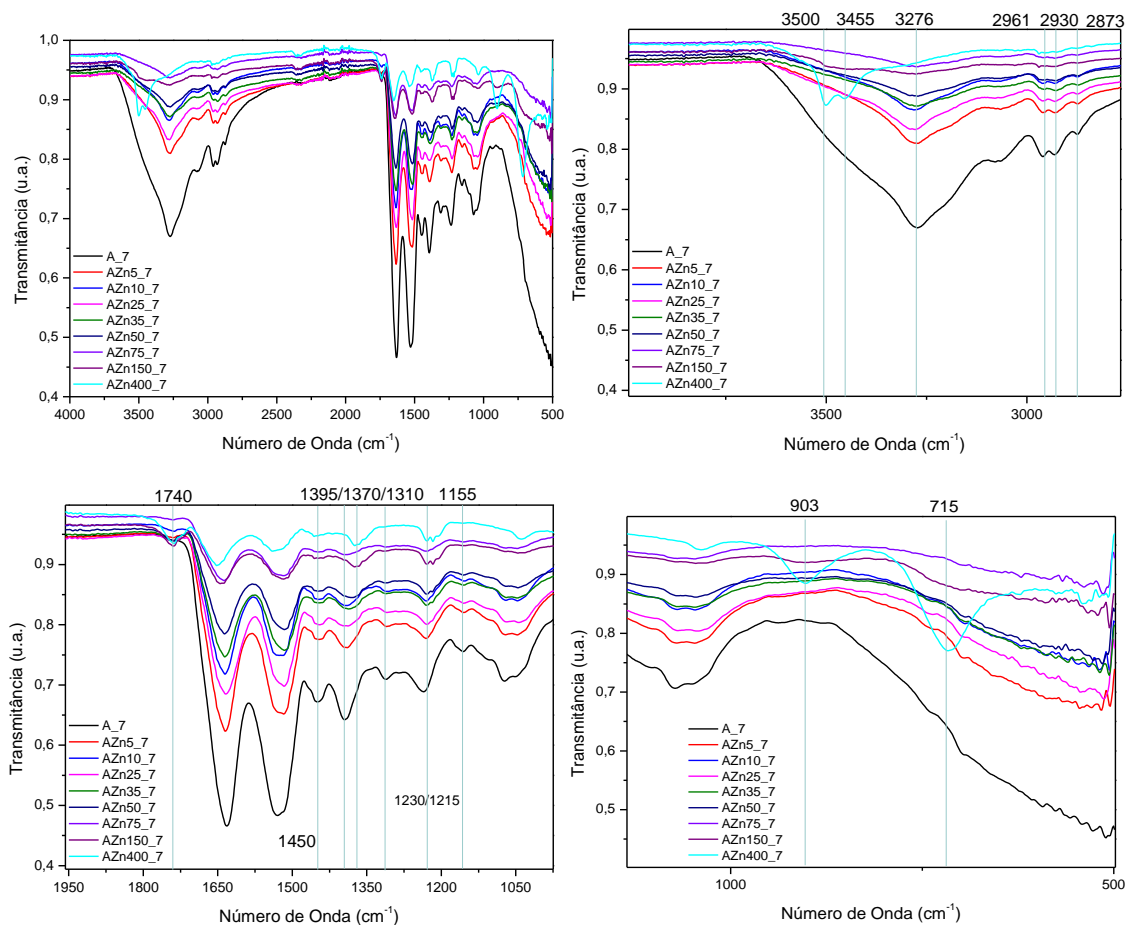


Figura 28. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com albumina e zinco nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH em 7.

6.3.5. Caseína e ferro sem ajuste de pH

No conjunto de espectros de CFe (Figura 29), em 1737 cm^{-1} ocorre aparecimento de banda bem pronunciado com a adição do metal, típico de vibrações C=O. Ocorre deslocamento da banda em 1395 cm^{-1} demonstrado para a proteína para 1367 cm^{-1} para as demais amostras, que como já discutido para as amostras AFe_9 e AZn_7, pode ser indicativo de interações por meio dos grupos amidas. Em 1233 cm^{-1} , novamente ocorre mudança em relação à proteína. Para as amostras com o metal, ocorre ligeiro deslocamento para em torno de 1216 cm^{-1} e a formação de dois ombros, indicando interação dos grupos O-H de aromáticos com a proteína, como já observado em AFe_9. A banda em 1083 cm^{-1} referente a P-O diminui ao adicionarmos metais, indicando possivelmente uma interação deste grupo com o metal. Em

aproximadamente 900 cm^{-1} , banda típica de ligações P-O ocorre descolamento para maiores concentrações, o que corrobora com o observado em 1083 cm^{-1} .¹²⁹

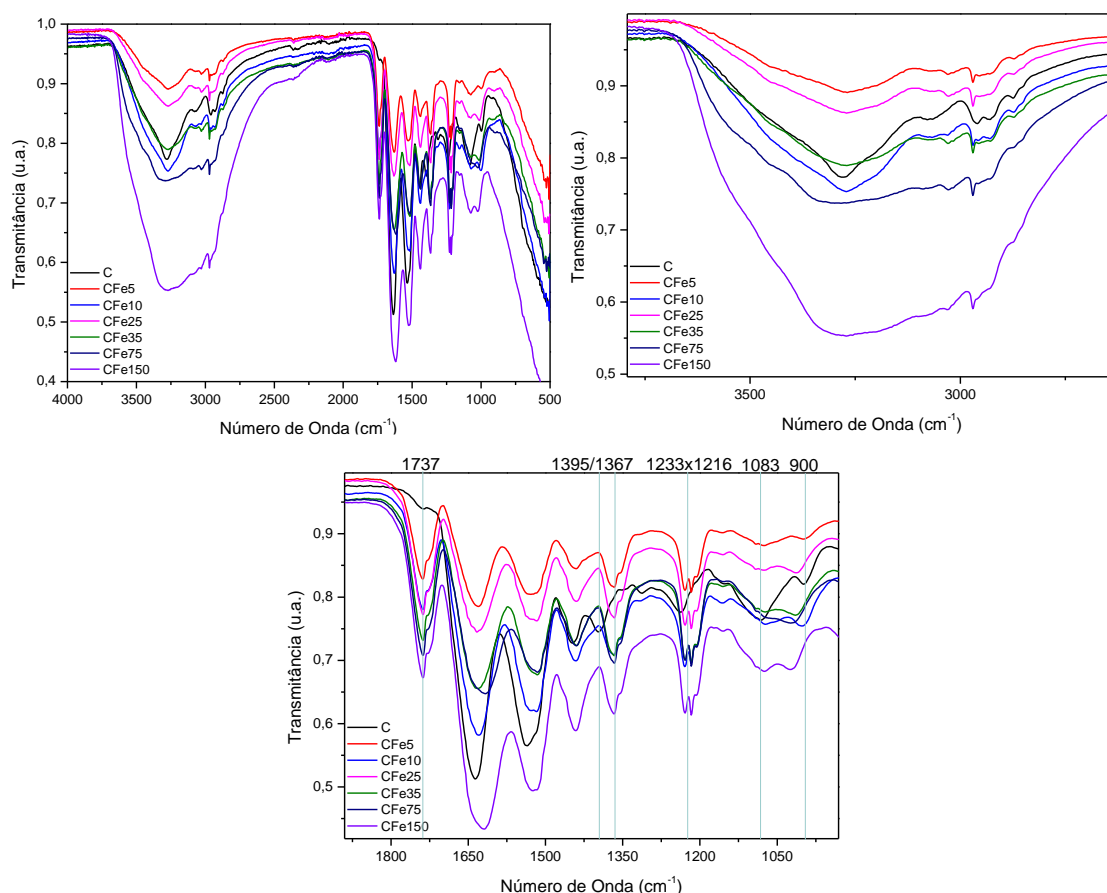


Figura 29. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e ferro nas concentrações de 0 a 150 mM, sem ajuste do pH.

6.3.6. Caseína e ferro com ajuste de pH

Para a amostra com ajuste de pH da mistura caseína e ferro (Figura 30) observou-se duas bandas em 2928 e 2873 cm^{-1} , típicas do estiramento C-H, para as amostras C_9 e CFe50_9, bem como, este aparecimento também pôde ser observado para as amostras AFe_9. A banda em 1740 cm^{-1} também seguiu o observado para a amostra AFe_9, ocorrendo aumento da intensidade correspondente à concentração. Ocorre o aparecimento de banda em 1395 cm^{-1} amostra C_9 e CFe50_9, assim como deslocamento para as demais amostras para em torno de 1365 cm^{-1} , indicando que possa estar ocorrendo interação com os grupos amida da proteína, como já citado

anteriormente. Em 1310 cm^{-1} observa-se banda típica de amida III ¹³³ somente para as amostras C_9 e CFe50_9, indicando que para as demais amostras pode estar ocorrendo interação por meio deste grupo funcional, o que corrobora com o observado em 1395 cm^{-1} . Em aproximadamente 1230 cm^{-1} nota-se uma banda da proteína, para as demais amostras este pico é deslocado para em torno de 1215 cm^{-1} . Esta faixa é típica de O-H de porções aromáticas, logo pode ser inferido que esses grupos podem estar servindo de sítios de ligação para o metal¹³⁹. Em 1077 e 981 cm^{-1} são observadas as bandas referentes à ligação P-O e que variam com as concentrações avaliadas, indicando que este grupo funcional sofre mudanças durante a reação.

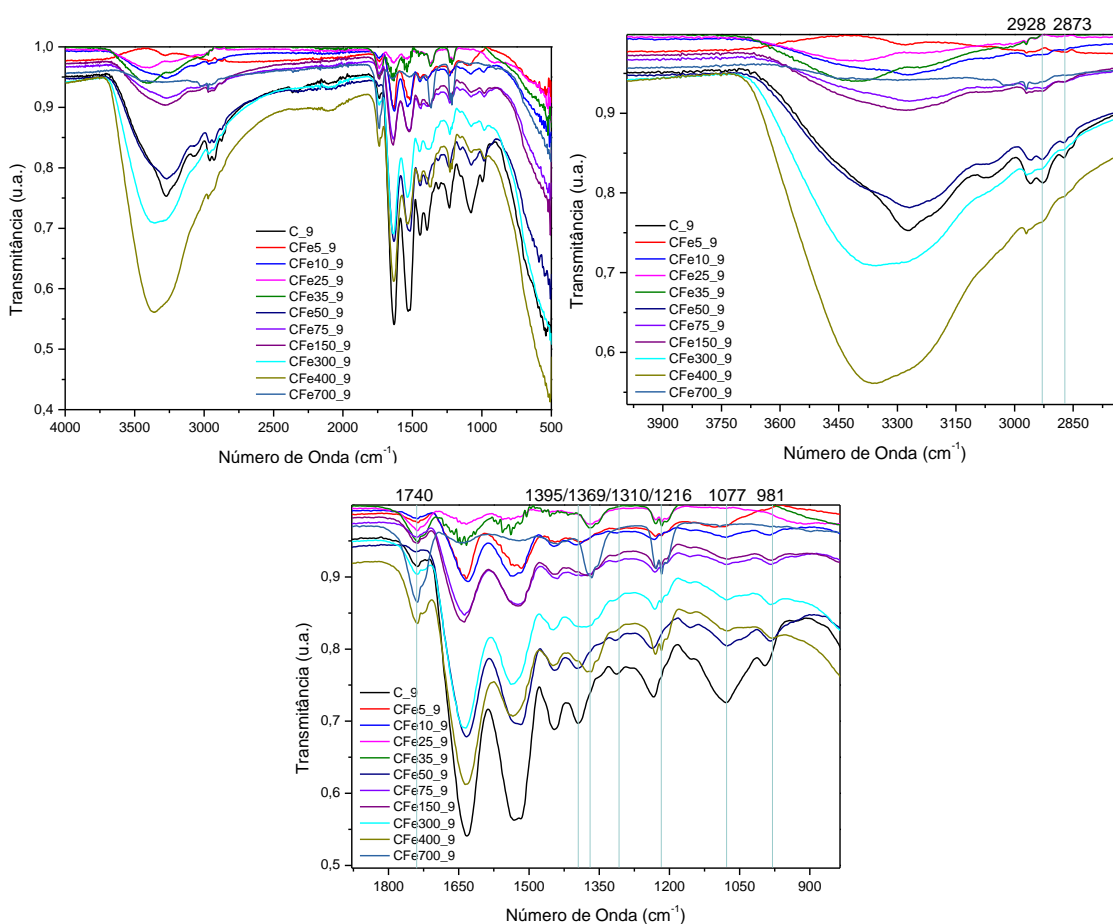


Figura 30. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e ferro nas concentrações de 0 a 700 mM, com ajuste do pH em 9.

6.3.7. Caseína e zinco sem ajuste de pH

Para o conjunto de espectros das amostras CZn (Figura 31), em 3270 ocorre aumento significativo da intensidade para CZn25, enquanto as demais diminuem com a adição do metal. Esta mudança nesta faixa pode ser típica da banda amida I (modo de estiramento N-H) e pode ser uma evidência adicional de alterações na estrutura das caseínas¹²⁶. Em 1397 cm^{-1} , região típica das amidas, a banda se torna aparente somente para C e CZn25, indicando que nessas amostras não houve alteração do grupo funcional, e que conseqüentemente a ligação metal-proteína pode ser desfavorecida. As demais bandas não sofreram mudanças significativas.

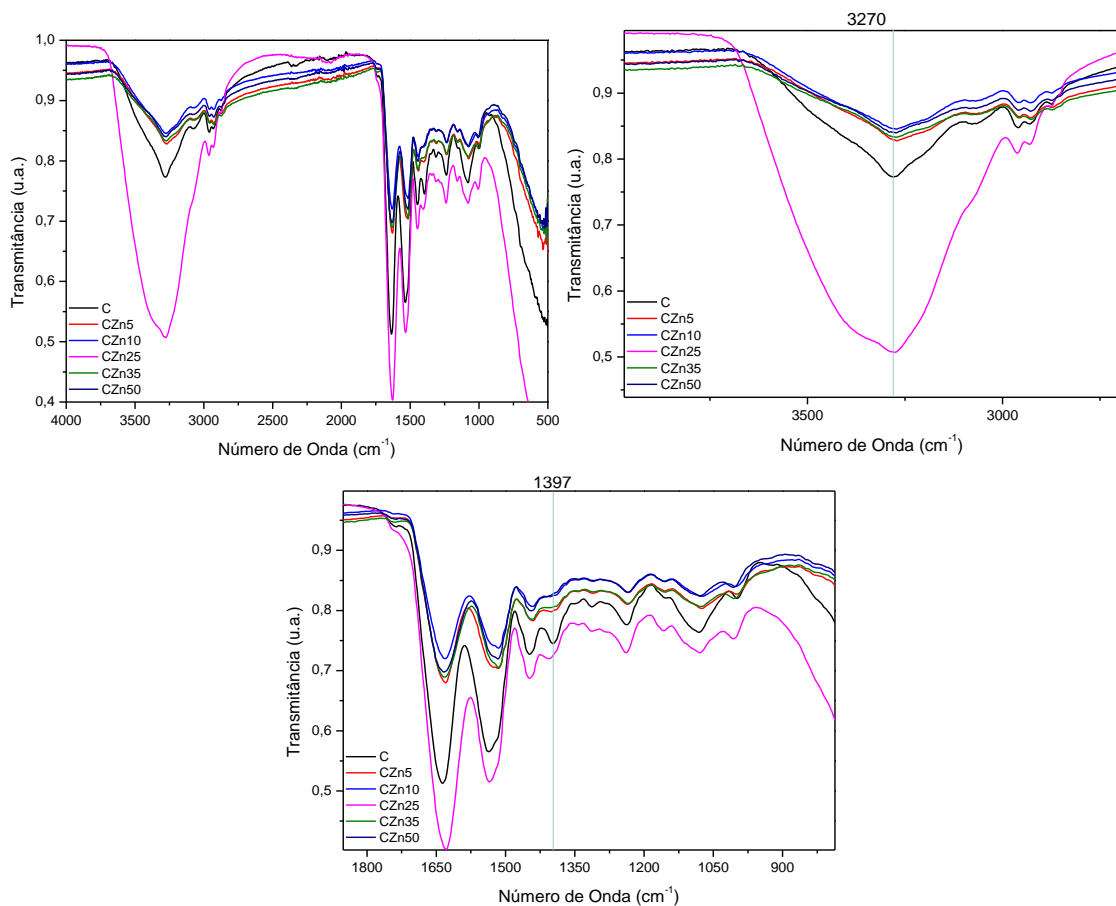


Figura 31. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e zinco nas concentrações de 0 a 50mM, sem ajuste do pH.

6.3.8. Caseína e zinco com ajuste de pH

No caso da amostra CZn_7 (Figura 32), em 2961 e 2925 cm^{-1} observa-se a diminuição das bandas, típicos de estiramento C-H, proporcionalmente ao aumento da concentração de metal. Em 1396, 1307 e 1078 cm^{-1} ocorre desaparecimento das bandas, exceto para a amostra somente com caseína e na menor concentração de metal. Essas bandas são típicas de amidas e fosfatos, indicando que esses grupos podem estar interagindo com o zinco. Em 895 e 706 cm^{-1} , região típica novamente de ligações P-O, ocorre somente nas concentrações mais elevadas (CZn300_7 e CZn400_7), assim como aparecimento de banda somente para amostra mais concentrada em 620 cm^{-1} , região típica de ligações Metal-O ou Zn-OH, podendo indicar a formação de óxidos ou hidróxidos de zinco ^{131,140}

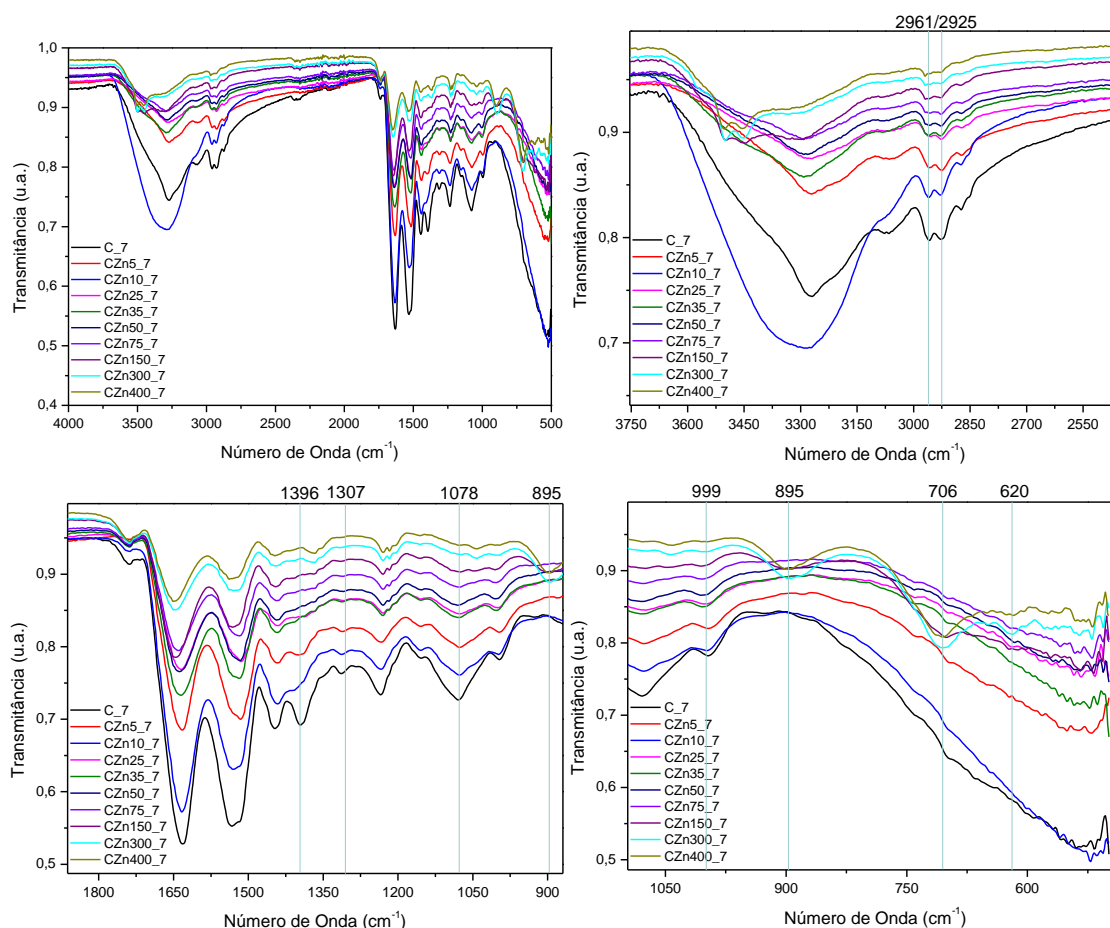


Figura 32. Conjunto de espectro de infravermelho para as partículas sintetizadas com caseína e zinco nas concentrações de 0 a 400 mM, com ajuste do pH em 7.

Em geral, observaram-se mudanças significativas frente a grupamentos específicos da proteína, tais como amidas primárias, secundária e terciárias com a formação das partículas metálicas. Estes grupamentos podem ter servido como sítios de interação das proteínas com os metais. As bandas típicas em 1395 cm^{-1} apresentaram deslocamento em boa parte das amostras, sugerindo que ocorreu alteração nas amidas terciárias da proteína. Outra fração modificada foi a em 1310 cm^{-1} referente a ligação O-H de porções aromáticas, onde a banda se desdobrou em duas quando da elevação da concentração dos metais adicionados. As amostras AZn, CZn e CZn_7 foram as que apresentaram menores mudanças nos espectros, isso se deve muito provavelmente a uma fraca ligação entre as proteínas e os metais por meio dos grupos analisados e discutidos. Essa diminuição de interação pode ser corroborada com os ensaios de DLS, onde as amostras de proteínas com zinco obtiveram maiores tamanhos. Esse aumento de tamanho, justificado pela presença de metal na superfície da proteína e a formação de hidróxidos, pode fazer com que ocorra diminuição da interação metal-proteína, desfavorecendo ligações que possam estar ocorrendo no interior da proteína. As demais amostras corroboram com a hipótese onde sugere-se que o metal, além de estar situado na superfície da proteína, pode estar mais fortemente interagindo no interior da estrutura, fazendo com que então sejam propiciadas maiores interações.

6.4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO METAL-PROTEÍNA POR FLUORESCÊNCIA

6.4.1. Espectros de Fluorescência

Inicialmente foi realizada análise da intensidade de fluorescência das proteínas caseína e albumina em diferentes pHs com a finalidade de estimar o pH no qual as proteínas apresentariam a maior intensidade de fluorescência. Os espectros foram coletados em comprimento de onda de excitação de 280 nm e emissão de 280-450 nm, visando avaliar a fluorescência intrínseca dos resíduos de aminoácidos das proteínas, que são, principalmente, a fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 33). Em especial o resíduo de aminoácido triptofano, que é encontrado em menor proporção.^{141,142}

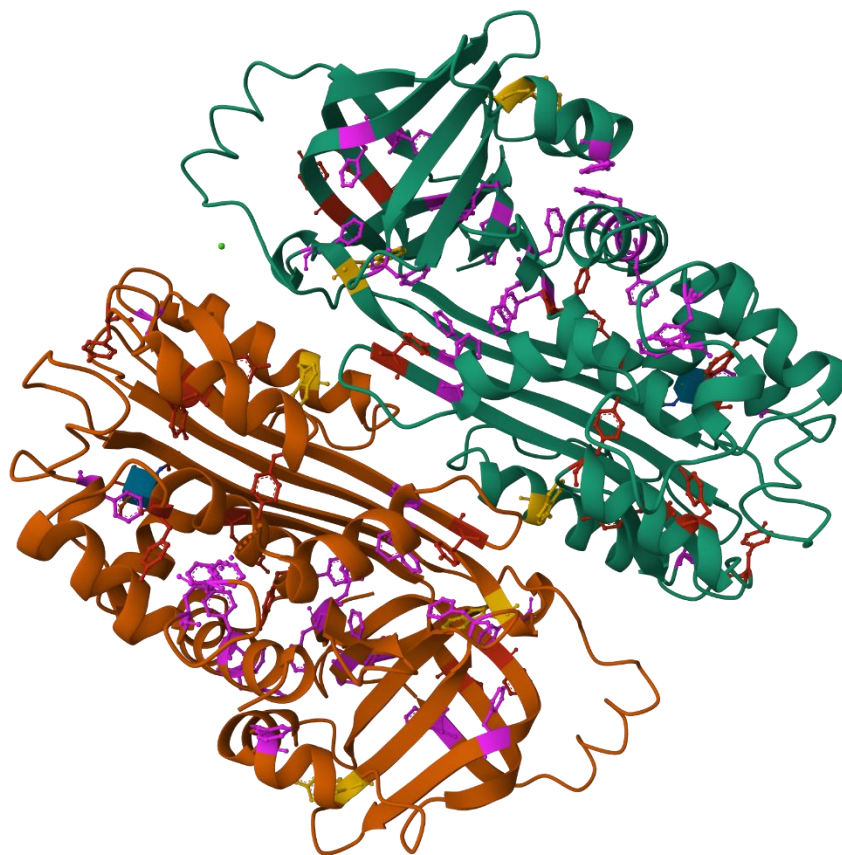


Figura 33. Estrutura quaternária da ovalbumina evidenciando os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura: triptofano (●), fenilalanina (●) e tirosina (●). (Adaptado de RSCB - Protein Data Bank, 2024).

Para isso, foram realizadas medidas de fluorescência das soluções das proteínas variando o pH nos valores de 6; 7; 8 e 9. Os espectros de fluorescência encontram-se em anexo. Os primeiros resultados (Figura 34A e 34B) são referentes às proteínas albumina e caseína, respectivamente, sem adição de metais e em comprimento de onda de excitação de 280 nm. Em seguida foram realizados ensaios com as partículas formadas usando como precursores o $ZnCl_2$ ou $FeCl_3$ na concentração de 50 mM e com pH ajustado nos valores previamente citados. Ao avaliar as amostras somente contendo 2% m/v de proteína e alterando o pH das soluções, podemos observar que para a amostra de albumina não foi detectada

relação do aumento da intensidade de fluorescência com a variação de pH, a ordem de intensidade foi $A8 > A9 > A6 > A (\sim \text{pH } 10) > A7$.

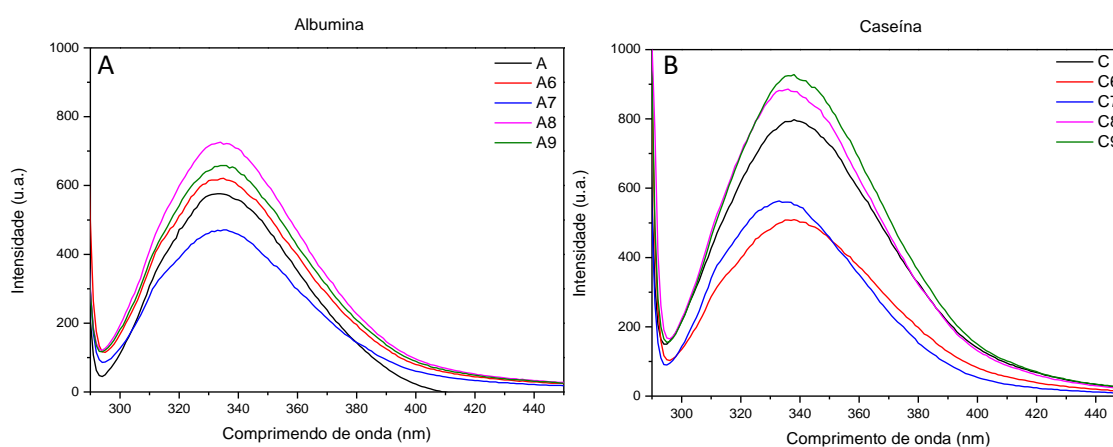


Figura 34. Espectro de fluorescência para soluções contendo 2% de albumina (A) e caseína (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

A caseína por sua vez apresenta maior relação com a variação do pH. Observa-se que a intensidade de fluorescência foi $C9 > C8 > C (\sim \text{pH } 7,2) > C7 > C6$, ou seja, com o aumento do pH observa-se o aumento de intensidade. Este aumento de intensidade pode estar diretamente relacionado com a estrutura proteica. A amostra C9 apresentou tamanho de $0,200 \mu\text{m}$ (100%) durante as análises de DLS. Já a amostra C7 e C apresentaram tamanhos de $0,256$ e $0,318 \mu\text{m}$, com formação de agregados de aproximadamente $5 \mu\text{m}$. A formação dos agregados pode estar influenciando na intensidade de fluorescência da proteína, de forma a prejudicar a análise. Já a faixa de pH elevada é distante do ponto isoelétrico da proteína, o que pode indicar que nesse caso a mesma possa estar com carga residual negativa na sua superfície, fazendo assim com que grupos como o triptofano e demais cromóforos estejam com carga residual modificada, aumentando assim sua fluorescência. Esta carga residual negativa foi constatada pelas medidas de potencial zeta para a proteína em pH 7, 9 e sem ajuste, onde apresentaram valores de pZ iguais a -13, -10,9 e -22,9 mV, respectivamente.

Em ambas as proteínas, a maior intensidade de fluorescência foi observada para as partículas sintetizadas com 50mM de ferro no pH igual a 9 (Figura 35A e 35B). Vale salientar que ocorreu supressão significativa da intensidade de fluorescência das proteínas ao adicionar o íon férrico à solução, o que indica um possível processo de

quenching do metal, que se refere a um processo no qual a fluorescência de uma molécula, no caso a proteína, é reduzida por algum agente externo adicionado ao meio. Esse fenômeno ocorre quando a molécula excitada que emite luz (fluoróforo) interage com outra molécula (*quencher*) e transfere energia para ela, resultando na diminuição da fluorescência.

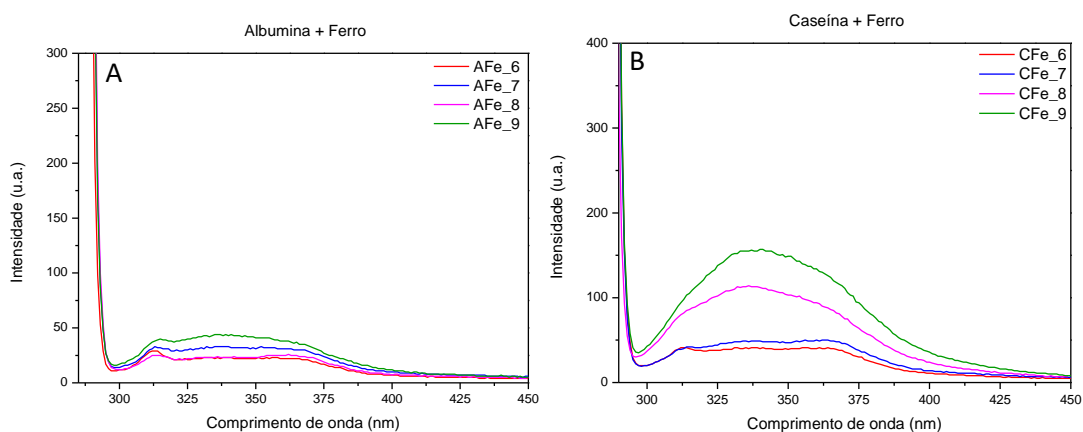


Figura 35. Espectro de fluorescência para as soluções contendo as partículas formadas com 2% de albumina e 50 mM de FeCl_3 (A) e 2% de caseína e 50 mM de FeCl_3 (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Já em relação as partículas sintetizadas com 50mM de zinco, foi observada maior intensidade em pH igual a 7, para albumina (Figura 36A) e caseína (Figura 36B), indicando assim que este valor de pH é mais apropriado para monitoramento das mudanças de interação entre grupos cromóforos e íons metálicos. Portanto, os pHs selecionados para o estudo da interação metal-proteína, por fluorescência, foi o 9,0 para o ferro e o 7,0 para o zinco.

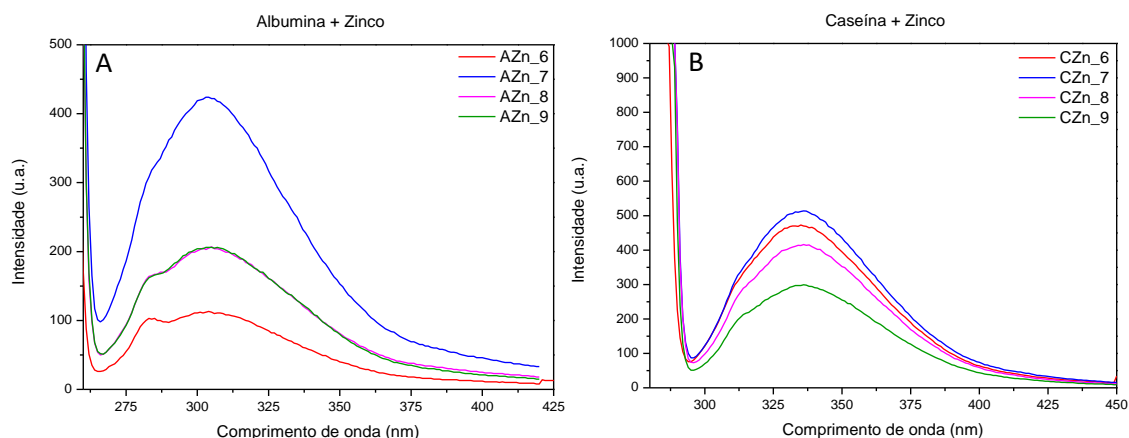


Figura 36. Espectro de fluorescência para as soluções contendo as partículas formadas com 2% de albumina e 50 mM de ZnCl₂ (A) e 2% de caseína e ZnCl₂ (B) variando o pH e em comprimento de onda de excitação de 280 nm.

Para melhor avaliar o tipo de interação proteína-metal para a formação da partícula, realizou-se um estudo do efeito da concentração de metal adicionado em relação à proteína. Neste caso, optou-se por manter a concentração da proteína fixa (2% m/v) e variou-se a concentração de metal adicionado de 0 a 700 mM. Esta avaliação foi realizada nos valores de pH determinados anteriormente (6, 7, 8 e 9) e também sem o ajuste de pH após a adição do metal à proteína (os resultados completos encontram-se em anexo). Para esses testes, foram selecionados dois comprimentos de onda de excitação, 280 e 295 nm. Estudos relatam que é observada a fluorescência de diferentes resíduos de aminoácidos no comprimento de onda de excitação de 280 nm, como triptofano, fenilalanina e tirosina, e no comprimento de 295 nm, tem-se triptofano como o único aminoácido aromático a absorver luz nesse comprimento de onda.^{141,142}

A seguir serão apresentados os resultados das fluorescências referentes à avaliação da síntese de partículas com diferentes concentrações de metal e as duas proteínas e sua relação com o pH ajustado ou não. Além disso, serão apresentados os gráficos referentes ao valor de intensidade de fluorescência em 280 e 295 nm corrigida pelo fator de diluição das amostras em relação à concentração de metal usado na formação da partícula.

As amostras contendo as partículas sintetizadas com albumina e ferro sem ajuste de pH apresentaram supressão significativa nos espectros (Apêndice A) de fluorescência em todas as concentrações avaliadas, com relação à solução contendo apenas 2% de albumina. Ao corrigir a intensidade de fluorescência considerando o fator de diluição (Figura 37), podemos observar claramente uma diminuição drástica da intensidade de fluorescência máxima, com supressão quase total desde concentrações relativamente baixas (5 e 10 mM). Vale salientar que nas concentrações de 50 mM e 75 mM, para os comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm, respectivamente, ocorreu um aumento da intensidade de fluorescência, o que pode indicar alguma modificação da interação do ferro com a proteína.

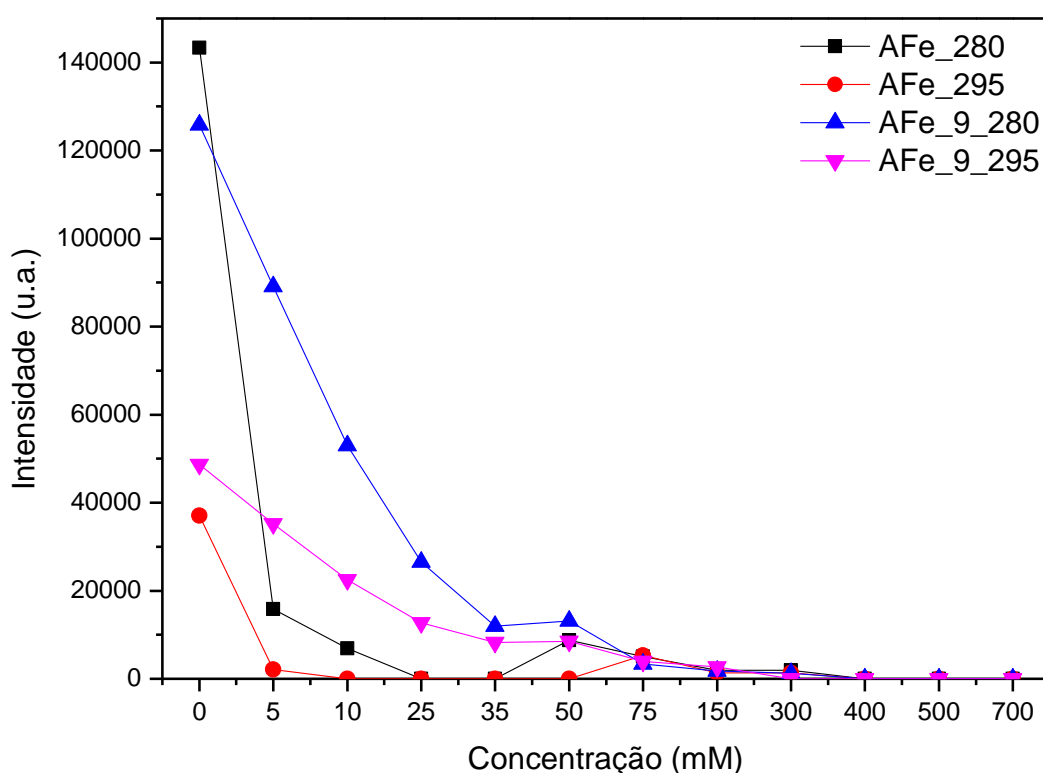


Figura 37. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de albumina, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de ferro adicionado na síntese das partículas sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 9 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Para as amostras de albumina e ferro com pH ajustado em 9, observou-se diminuição da supressão de fluorescência em relação às amostras sem ajuste de pH. Isso indica que possivelmente esteja havendo mudança de interação entre a proteína

e o metal, devido provavelmente pela mudança conformacional da proteína nesse pH. Segundo análises do tamanho de partículas para estas amostras, o valor encontrado quando do ajuste de pH foi entre 2-4 μm , enquanto para as amostras sem ajuste de pH foi entre 0,2 e 4 μm . O aumento de tamanho observado nas partículas quando do ajuste de pH pode corroborar com a hipótese de que esteja ocorrendo mudança conformacional na estrutura da proteína.

No pH 9,0, considerando-se o comprimento de onda de 280 nm (Figura 37 ■ e ▲), observa-se maior intensidade de fluorescência nas concentrações de 0 a 75nm comparado ao comprimento de onda de 295 nm (Figura 37 ■ e ●). Isto deve-se possivelmente ao fato de que em 280 nm, a mudança conformacional da proteína, nesse pH, propiciou uma maior exposição de outros resíduos de aminoácidos além do triptofano comparado com a conformação da albumina sem ajuste de pH. Em geral, podemos observar que ocorreu uma diminuição gradativa da fluorescência com o aumento da concentração do metal, o que difere das amostras sem ajuste de pH (Figura 37 ■ e ●), as quais apresentam decréscimo acentuado já nas primeiras concentrações. Mais uma vez, a concentração de 50 mM apresenta aumento da fluorescência, porém neste caso nos dois comprimentos de onda. Apesar das diferenças observadas no pH 9,0 em relação aos ensaios sem ajuste de pH, pode-se observar a interação dos íons de ferro desde a concentração de 5 mM.

As partículas sintetizadas com caseína e ferro sem ajuste de pH e com ajuste de pH para 9 apresentaram semelhanças com as partículas sintetizadas usando albumina discutidas anteriormente, ou seja, apresentaram supressão da fluorescência, porém nesse caso foi menos pronunciada em concentração mais baixas (5 e 10mM), isto porque nestas faixas de concentração podem estar ocorrendo mudanças estruturais na proteína devido a presença dos íon metálico em solução, fazendo com que os resíduos fluorescentes permaneçam mais expostos na caseína em comparação à albumina. .

Quando comparada a intensidade de fluorescência corrigida, (Figura 38) observa-se que nas primeiras concentrações chega a ocorrer aumento da fluorescência em relação à caseína sem adição de metais no comprimento de onda de 280 nm com e sem ajuste de pH (Figura 38 ■ e ▲), isto pode ser explicado por

uma maior exposição de grupos cromóforos da proteína em contato com o metal, o que não se nota tão pronunciado quando das análises em comprimento de onda de 295 nm (Figura 38 ● e ▼), onde a intensidade é consideravelmente inferior. Logo pode-se inferir que os grupamentos cromóforos além do triptofano (único a emitir em 295 nm), podem estar mais expostos. Além disso, ocorre diminuição ligeiramente linear da intensidade relativo à concentração, indicando que o cromóforo perde sua intensidade de fluorescência por meio da interação com o metal.

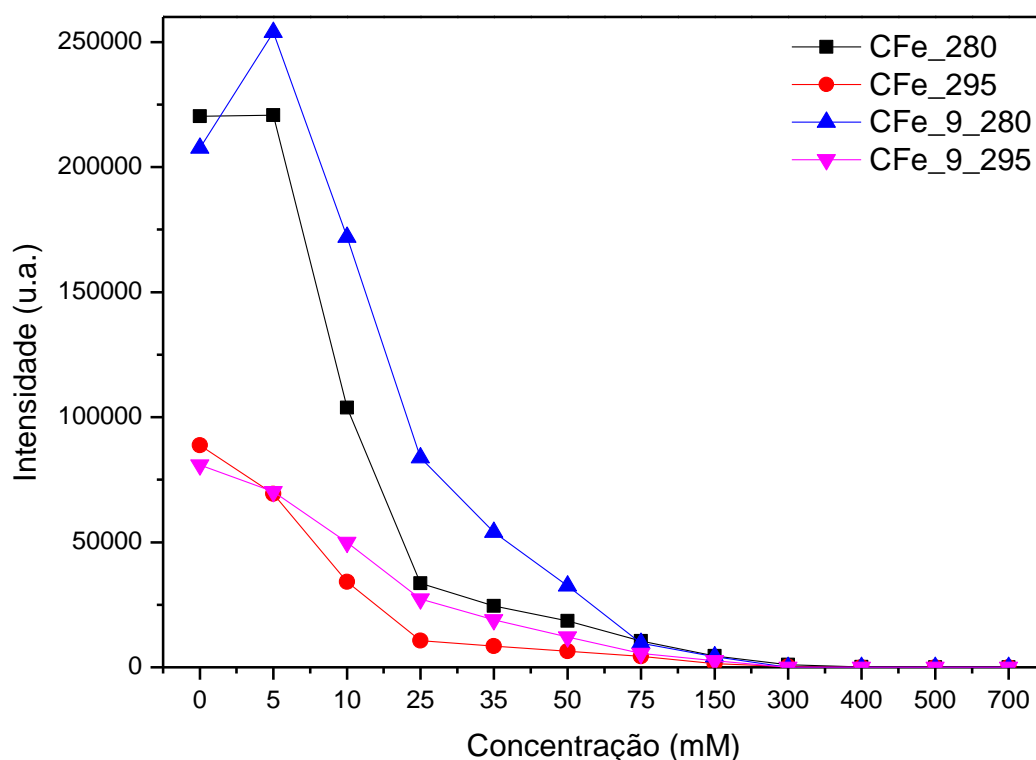


Figura 38. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de caseína, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de ferro adicionado na síntese das partículas sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 9 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

As partículas sintetizadas com albumina e zinco apresentaram intensidade de fluorescência mais elevadas quando comparadas com as amostras contendo albumina e ferro, indicando que possivelmente o zinco esteja interagindo de tal forma que os grupos funcionais cromóforos da albumina estejam mais expostos e que a interação do íon com estes grupos não seja do tipo *quenching*. Além disso, é considerável a mudança de intensidade nas amostras em comprimento de onda de

280 nm (Figura 39 ■ e ▲), onde para a amostra sem ajuste de pH (Figura 39 ■) ocorre elevado aumento da intensidade de fluorescência em comparação à proteína pura, indicando que o metal de certa forma, mais uma vez, favorece a exposição dos grupos cromóforos, não sendo exclusivamente, neste caso, o triptofano. Já em comprimento de onda de 295 nm (Figura 39 ● e ▼), para as duas condições podemos observar que ocorre diminuição da intensidade de fluorescência, comparado às medidas de em 280 nm, após a interação da albumina com o metal o que pode indicar então que esteja ocorrendo maior interação do zinco com o triptofano, visto que neste comprimento de onda somente ele emite fluorescência.

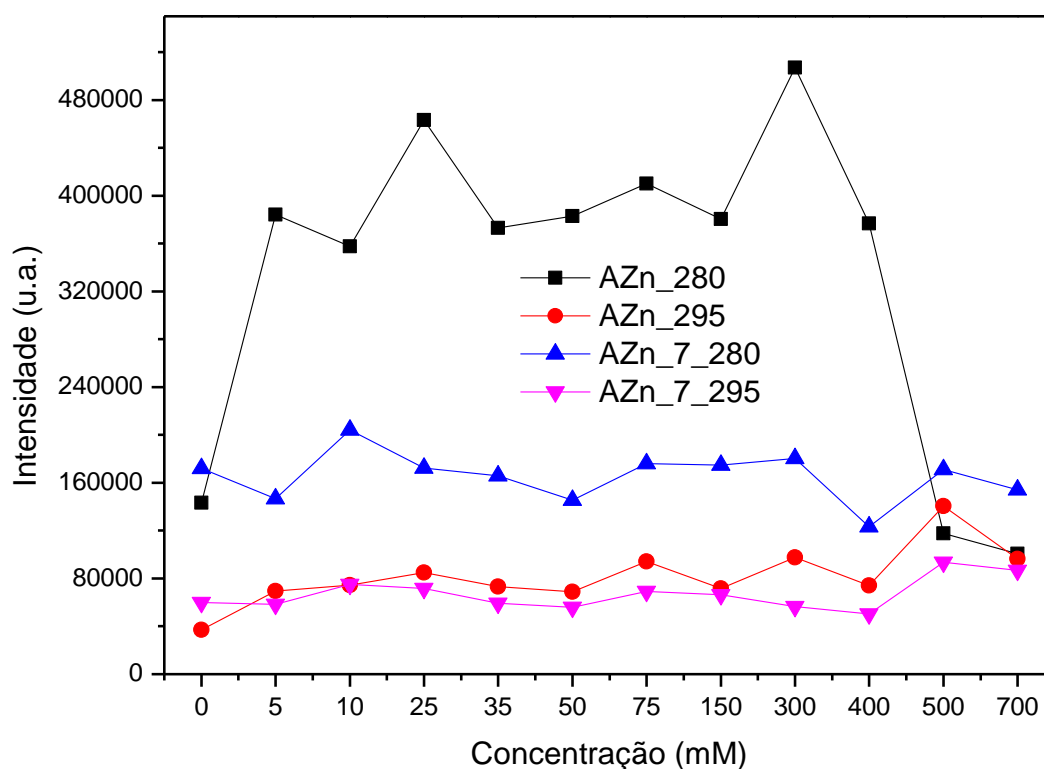


Figura 39. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência da albumina, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de zinco adicionado, sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 7 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Por fim, as partículas sintetizadas com caseína (Figura 40) apresentaram grande variação da intensidade de fluorescência, principalmente nos comprimentos de onda de 280 nm sem (Figura 40 ■) e com ajuste de pH (Figura 40 ▲). Para a amostra CZn_280 e CZn_295 podemos observar que nas concentrações de 35 e 500

mM foi observado aumento da fluorescência, comparado às demais concentrações, assim como diminuição em 5, 10 e 150 mM. Isto pode ser um indicativo que nas concentrações onde houve aumento de fluorescência esteja ocorrendo maior exposição dos grupos funcionais da proteína devido à mudança de conformação da proteína pela interação com o metal, enquanto a diminuição pode indicar obstrução dos grupos funcionais pela interação metal-proteína. Além disso, como já observado para a albumina pura, o comprimento de onda de 280 nm apresentou maior intensidade de fluorescência, indicando que neste caso outras porções de aminoácidos que não o triptofano podem estar mais expostas para interações.

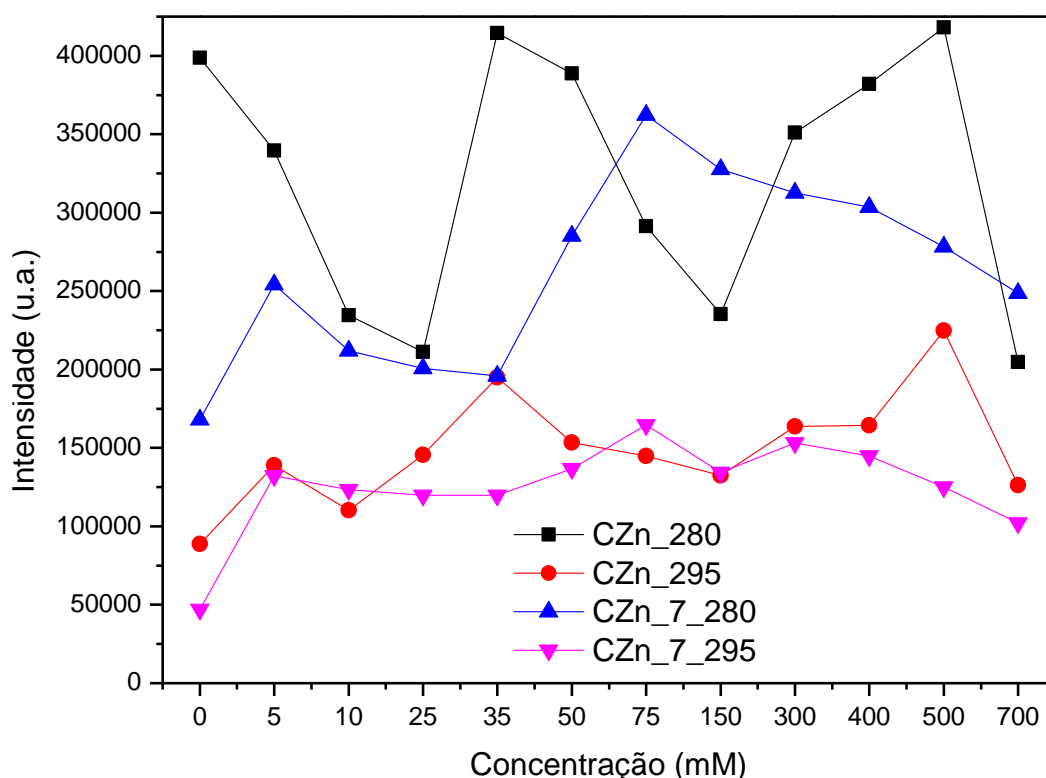


Figura 40. Relação entre a intensidade máxima de fluorescência de caseína, corrigida em relação ao fator de diluição, versus a concentração de zinco adicionado, sem ajuste de pH (■ e ●) e em pH 7 (▲ e ▼), nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.

Como podemos observar, houve mudanças significativas na intensidade de fluorescência com a adição dos metais, no caso do ferro ocorreu supressão de fluorescência, já o zinco apresentou pouca relação entre a concentração do metal a

intensidade de fluorescência. Portanto, faz-se necessário um estudo mais aprofundado dos dados para analisar as possibilidades de interação que estão ocorrendo entre as proteínas e os metais. Além disso, considerando os resultados anteriores, podemos concluir que o comprimento de onda de excitação de 280 nm é mais apropriado para os ensaios a seguir, visto que apresenta maior intensidade de fluorescência em todos os casos analisados, tornando então possível a análise de outros aminoácidos além do triptofano.

6.4.2. Análise da supressão de fluorescência devido a interação metal-proteína

Os resultados apresentados anteriormente serviram de base para a análise da supressão de fluorescência devido a interação metal-proteína. A supressão da fluorescência pode ser classificada de duas formas, como dinâmica ou estática. No caso do *quenching* colisional, o *quencher* deve difundir-se até o fluoróforo durante a vida útil do estado excitado. Após o contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental, sem emissão de um fóton. Em geral, o *quenching* ocorre sem nenhuma mudança permanente nas moléculas, ou seja, sem uma reação fotoquímica. No *quenching* estático, forma-se um complexo entre o fluoróforo e o *quencher*, e esse complexo é não fluorescente. Para que o *quenching*, seja estático ou dinâmico, o fluoróforo e o *quencher* devem estar em contato.^{141,143} Se a proteína ou membrana for impermeável ao *quencher*, e o fluoróforo estiver localizado no interior da macromolécula, então nem o *quenching* colisional nem o estático podem ocorrer.¹⁴¹

Os dados de extinção da fluorescência foram analisados de acordo com a equação de Stern–Volmer (equação 5), da qual podemos prever a existência de supressão devido a linearidade dos dados ajustados a equação. A curva plotada foi ajustada por meio de regressão linear e então obteve-se a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e constante bimolecular de supressão (K_q).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [M] = 1 + K_{SV} [M] \quad (5)$$

Onde:

F_0 : é a intensidade de fluorescência sem a adição de metal;

F: é a intensidade de fluorescência com a adição de metal;

K_q : é a constante bimolecular de supressão;

τ_0 : é o tempo de meia vida do fluoróforo no estado excitado na ausência do supressor;

144,145

K_{sv} : é a constante de Stern-Volmer e;

[M]: é a concentração em mmol L⁻¹.

Os resultados referentes à avaliação da supressão podem ser verificados a seguir. No primeiro momento foram analisadas as supressões ocorridas pela albumina quando da adição de ferro em pH ajustado a 9 nos comprimentos de onda de 280 nm (Figuras 41A e 19B) e 295 nm (Figuras 41A e 41B). Observa-se que os dados totais, ou seja, sem descontar nenhum ponto, para a amostra AFe_9_280 (Figura 41A) não apresentou significativa linearidade, para tanto optou-se por selecionar os pontos de maior linearidade para realização do ajuste linear (Figura 41B).

A amostras AFe_9_295 apresentaram maior linearidade mesmo ao considerar todos os pontos da curva (Figura 41C), porém quando foram selecionados os pontos de menor concentração (Figura 41D), obteve-se maior linearidade. Vale salientar que as amostras de albumina e ferro sem ajuste de pH não apresentaram linearidade na faixa de concentração estudada, logo não são apresentadas.

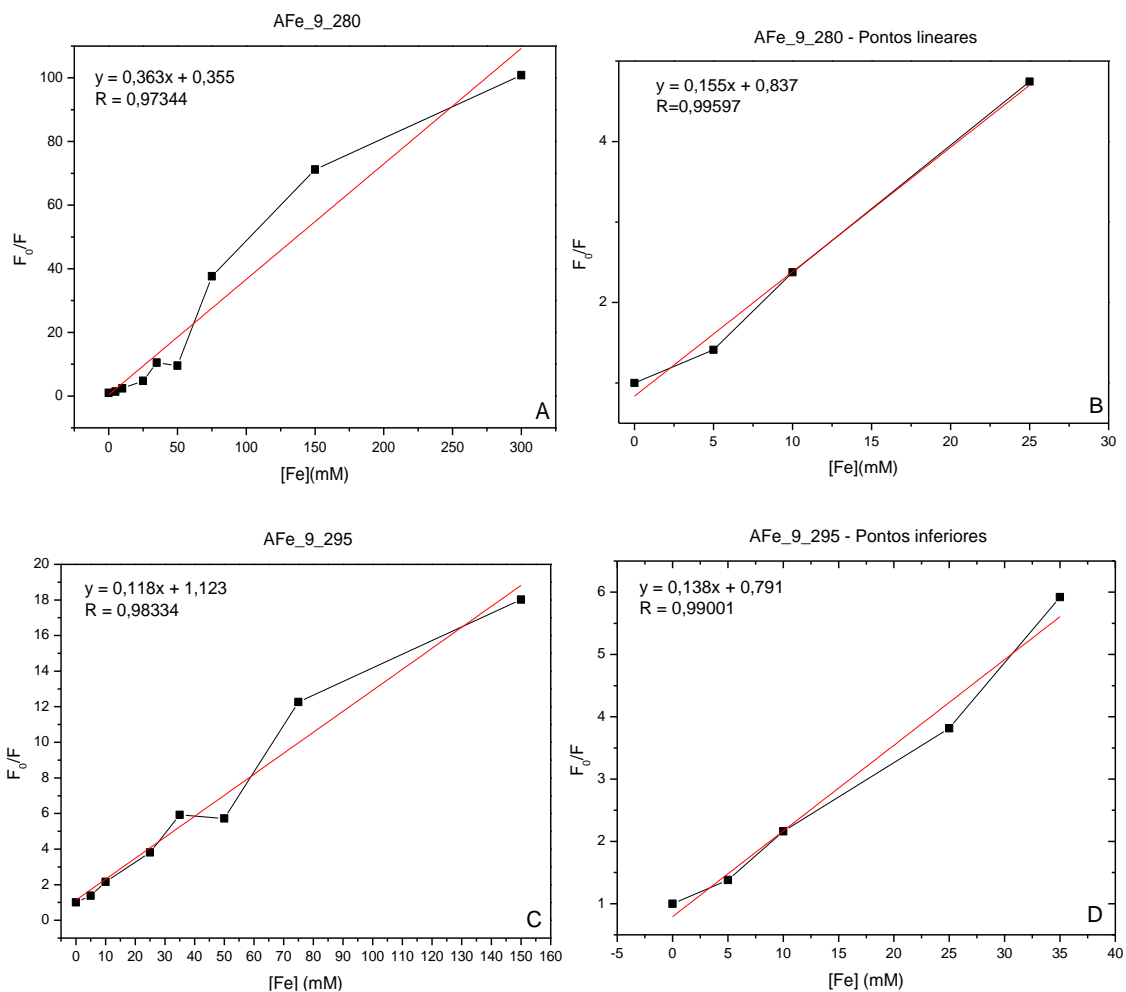


Figura 41. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da albumina pelo ferro com ajuste de pH igual 9 e em comprimento de onda excitação de 280 nm e 295 nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

As amostras com a proteína caseína e ferro sem ajuste de pH não apresentaram linearidade quando considerados todos os pontos da curva (Figura 42A e 42C), porém em concentrações inferiores (Figuras 42B e 42D) ocorre linearidade considerável.

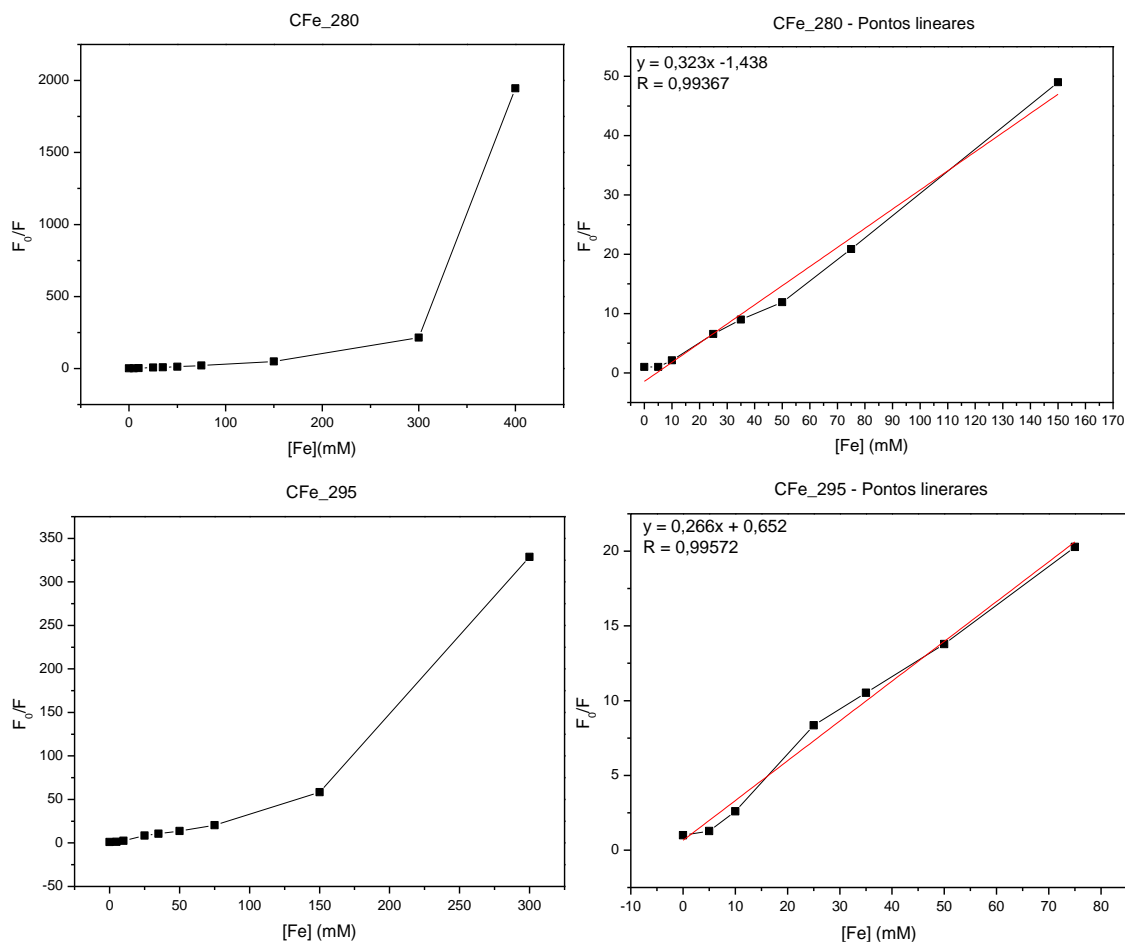


Figura 42. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da caseína pelo ferro sem ajuste de pH e em comprimento de onda excitação de 280 nm e 295 nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

Fato semelhante com os descritos anteriormente foram observados com as amostras de caseína quando do ajuste de pH igual a 9. Observou-se desvio da linearidade para a análise considerando todos os pontos (Figura 43A e 43C), porém quando escolhidos pontos de menor concentração (Figura 43B e 43D) os resultados foram apresentaram tendência ligeiramente mais linear. Ocorreu nestes casos um fato diferente do observado dos demais. Nos dois comprimentos de onda analisados podemos observar a ocorrência de desvios positivos em relação ao eixo y, ou seja, concavidade e tendência a ajuste de equação de segundo grau (Figura 44).^{141,146} Isso é característico se duas populações de fluoróforos estiverem presentes, e uma classe não for acessível ao *quencher*. Esse resultado é frequentemente observado no *quenching* da fluorescência do triptofano em proteínas por *quenchers* polares ou

carregados. Essas moléculas não penetram facilmente no interior hidrofóbico das proteínas, e apenas os resíduos de triptofano na superfície da proteína são suprimidos¹⁴¹.

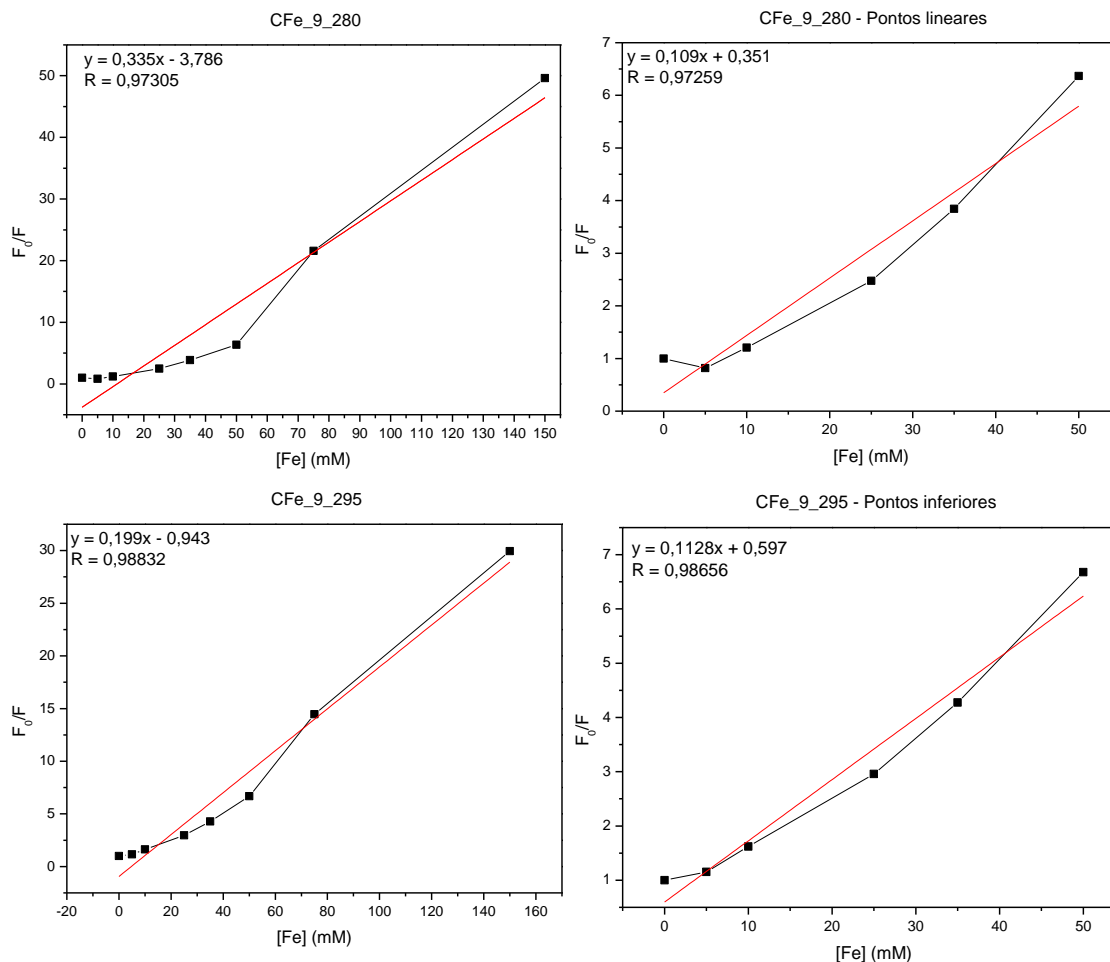


Figura 43. Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da caseína pelo ferro com ajuste de pH igual a 9 e em comprimento de onda excitação de 280nm e 295nm para todos os pontos (A e C) e pontos selecionados (B e D), respectivamente.

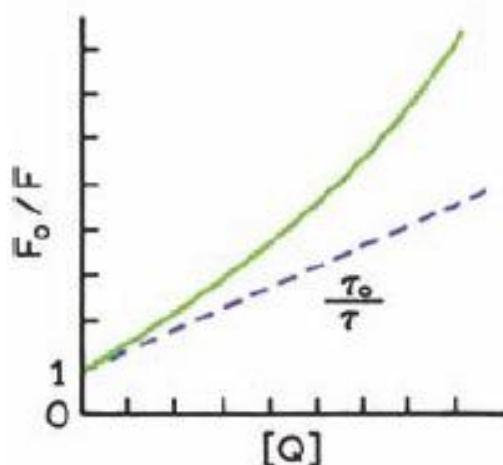


Figura 44. Exemplo de desvio da linearidade observado em amostras onde ocorrem simultaneamente supressões dinâmicas e estáticas. Adaptado de Lakowicz, 2006. ¹⁴¹

A partir das regressões lineares obtidas por meio do ajuste linear dos gráficos anteriores foi possível determinar a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e constante de bimolecular de *quenching* ou supressão (K_q) para cada amostra analisada (Tabela 10). Observa-se que na maioria dos casos a constante de Stern-Volmer é mais pronunciada quando da consideração de todos os pontos avaliados (todas as concentrações analisadas), porém sua linearidade é afetada, o que prejudica uma avaliação precisa desta constante. Para tanto, foram selecionadas as concentrações menores, visto a maior linearidade das curvas (Figuras 41 e 42). Podemos observar que estatisticamente, pelo teste de Tukey todas as constantes diferenciam-se. Logo pode-se observar que as partículas sintetizadas com caseína e ferro sem ajuste de pH, CFe_280 e CFe_295, apresentaram maior constante (327,1 e 266,3 M^{-1} , respectivamente) quando comparadas às demais amostras, indicando então uma maior supressão do fluoróforo (proteína) pelo *quencher*.

A constante bimolecular de *quenching* (K_q), exerce um papel crucial na interpretação dos resultados, reflete a eficiência do *quenching* ou a acessibilidade dos fluoróforos ao *quencher*. No caso de supressão dinâmica geralmente resulta em valores de K_q são próximos a $10^{10} M^{-1}s^{-1}$. Valores de K_q menores que o valor controlado por difusão podem resultar de blindagem estérica do fluoróforo, ou de uma baixa eficiência de *quenching*. Valores aparentes de K_q maiores que o limite controlado por difusão geralmente indicam algum tipo de interação de ligação ^{141,144}.

Tabela 10. Resultados referentes as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e contante bimolecular de supressão (K_q).

Amostra	K_{sv} (M^{-1})	K_q ($M^{-1} s^{-1}$)	R	Pontos (mM)
AFe_9_280	363,1	$3,63 \times 10^9$	0,9734	0-300
AFe_9_280	154,6	$1,55 \times 10^9$	0,9960	0-25
AFe_9_295	118,0	$1,18 \times 10^9$	0,9833	0-150
AFe_9_295	137,6	$1,38 \times 10^9$	0,9900	0-35
CFe_280	327,1	$3,27 \times 10^9$	0,9937	0-150
CFe_295	266,3	$2,66 \times 10^9$	0,9957	0-75
CFe_9_280	334,7	$3,35 \times 10^9$	0,9730	0-150
CFe_9_280	108,8	$1,09 \times 10^9$	0,9726	0-50
CFe_9_295	199,0	$1,99 \times 10^9$	0,9883	0-150
CFe_9_295	112,8	$1,13 \times 10^9$	0,9866	0-50

Os valores diferem estatisticamente entre si com base no teste de Tukey da ANOVA ($p = 0,05$).

No caso das amostras analisadas, podemos observar que todas possuem constante na faixa de $10^9 M^{-1} s^{-1}$, o que corrobora com outros quenchers que foram analisados em relação ao triptofano ¹⁴⁷ (Tabela 11). Isto infere então que a supressão seja do tipo dinâmica, apesar de estar no limiar da constante, o que pode ser um indicativo que na verdade podem estar ocorrendo os dois tipos de supressão. O que corrobora com o observado nas amostras de caseína com ferro em pH igual a 9, onde foram observados desvios positivos em relação ao eixo das abcissas, indicando que os dois métodos de supressão podem estar ocorrendo simultaneamente.

Tabela 11. Comparação de constantes bimoleculares de supressão para diferentes compostos frente ao triptofano.

Quencher	Kq x10⁷ (M⁻¹ s⁻¹)
Ligações Dissulfeto	> 1000 ^a
Acrilamida	720 ^a
Histidina - Cátion (pH 5,3)	240 ^a
Cisteína - Ânion (pH 10,4)	190 ^a
Cisteína - Neutra (pH 7,6)	140 ^a
Ácido acético	43 ^a
Ácido glutâmico	43 ^a
Ácido aspártico	43 ^a
N-acetilaspargina	8,8 ^a
N-acetilglutamina	6,5 ^a
Amida das proteínas	~0,1 - ~500 ^a
Histidina neutra (pH > 6)	3,7 ^a
AFe_9_280	363
AFe_9_280	155
AFe_9_295	118
AFe_9_295	138
CFe_280	327
CFe_295	266
CFe_9_280	335
CFe_9_280	109
CFe_9_295	199
CFe_9_295	113

Fonte: a) Calis (2014)¹⁴⁷

6.4.3. Estudo de interação entre metal-proteína através da constante de ligação (K_b) e pelo número de sítios ligantes (n).

A interação metal-proteína pode ser avaliada também pela constante de ligação (K_b) e pelo número de sítios ligantes (n). Esses valores podem ser determinados aplicando a seguinte equação 5:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_f + n \log [Q] \quad \text{Eq. 5}$$

Os dados são apresentados a seguir. Vale salientar que os dados que não seguiram a relação linear de Stern-Volmer não puderam ser aplicados nesta análise, como é o caso das amostras albumina com ferro sem ajuste de pH, albumina com zinco e caseína com zinco com e sem ajuste de pH. Podemos observar a seguir, os gráficos obtidos para as amostras AFe_9 (Figura 45), CFe (Figura 46) e CFe_9 (Figura 47), onde em todos os casos foram obtidas relações lineares. Os resultados estão apresentados na Tabela 12. Podemos observar que a ordem de grandeza da constante de ligação foi $CFe_9_{280} > CFe_{295} > CFe_{280} > AFe_9_{280} > CFe_9_{295} > AFe_9_{295}$ (Tabela 12). No caso das amostras de albumina podemos observar maior constante de ligação quando o comprimento de onda de 280 nm foi avaliado, o que pode indicar que outras porções além do triptofano podem estar interagindo com o metal. Já no caso da caseína sem ajuste de pH, a maior constante de ligação ocorreu em comprimento de onda de emissão de 295 nm, provavelmente proveniente de maiores interações do metal com a porção triptofano da proteína. Quando o pH foi ajustado para a caseína, observa-se o contrário, isso se deve muito provavelmente a uma mudança conformacional do tamanho da proteína ou da exposição de seus grupos funcionais, o que corrobora com o tamanho de partícula encontrado para estas amostras. Para a caseína sem ajuste de pH, os valores de tamanho observados foram entre 0,4 e 11 μm , enquanto quando do ajuste de pH os valores foram entre 2 e 4 μm , indicando que as amostras sem ajuste de pH tiveram uma faixa de tamanhos maior, fazendo com que mudanças na conformação da proteína e exposição dos grupos fluoróforos fosse modificada.

A dimensão das constantes é considerada relativamente baixa, comparada principalmente a amostras expostas a outros compostos, onde a ordem de constante

varia entre 10^2 até valores maiores, em torno de 10^6 M^{-1} para Albumina Sérica Bovina (BSA) ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, o que pode indicar uma interação de menor força entre a proteína e o metal.

Em relação ao número de sítios de ligação (n), podemos observar que para a maioria das amostras foram encontrados mais do que um sítio de ligação, com exceção de AFe_9_295. Observa-se que ocorre maior ligação a grupamentos da caseína comparado a albumina, principalmente no caso do ensaio de caseína com pH ajustado em 9, onde o número de sítio de ligações chega a 2. Outros estudos espectroscópicos são necessários para melhor elucidação de quais porções específicas, assim como grupamentos, são responsáveis por tamanhas interações, tais como análises de infravermelho.

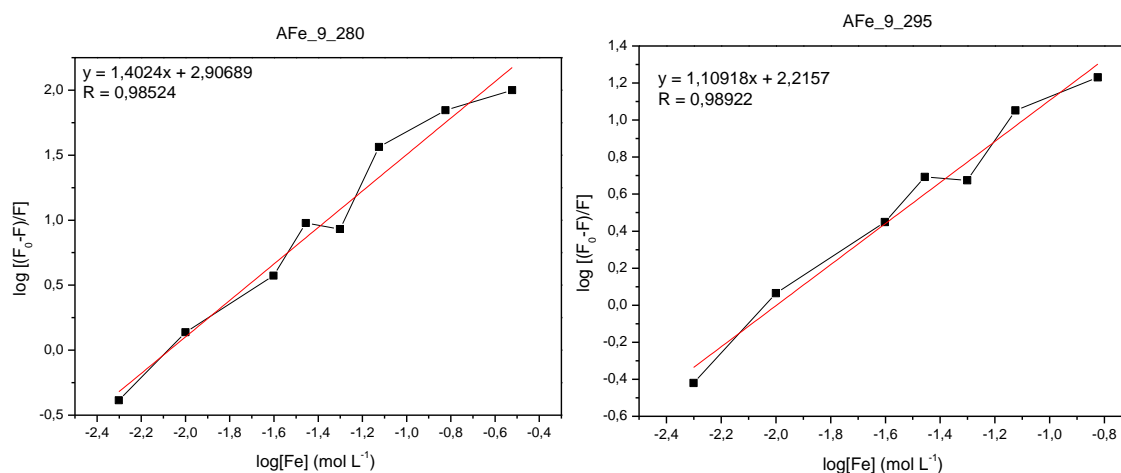


Figura 45. Gráficos de $\log[(F_0 - F)/F]$ vs $\log[Fe]$ para a albumina e o ferro em pH 9, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

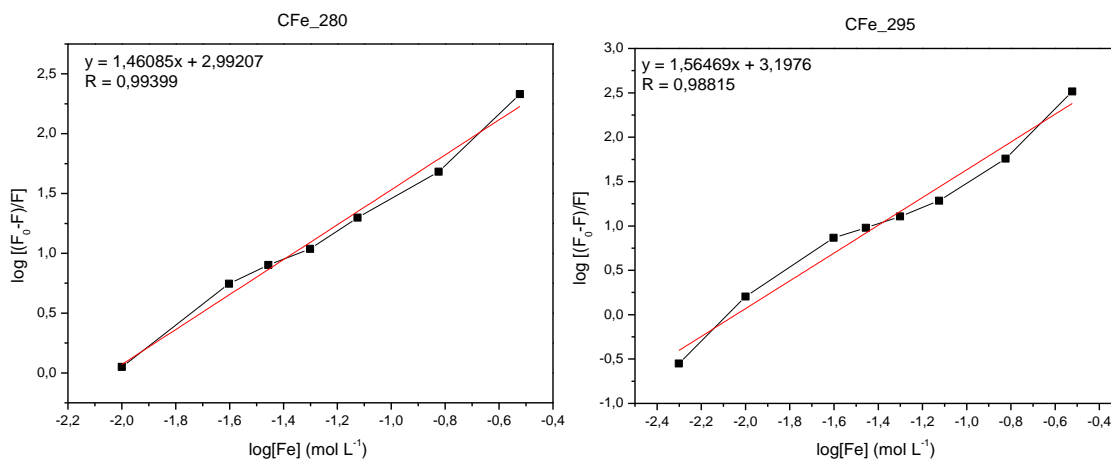


Figura 46. Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[Fe]$ para a caseína e o ferro sem ajuste de pH, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

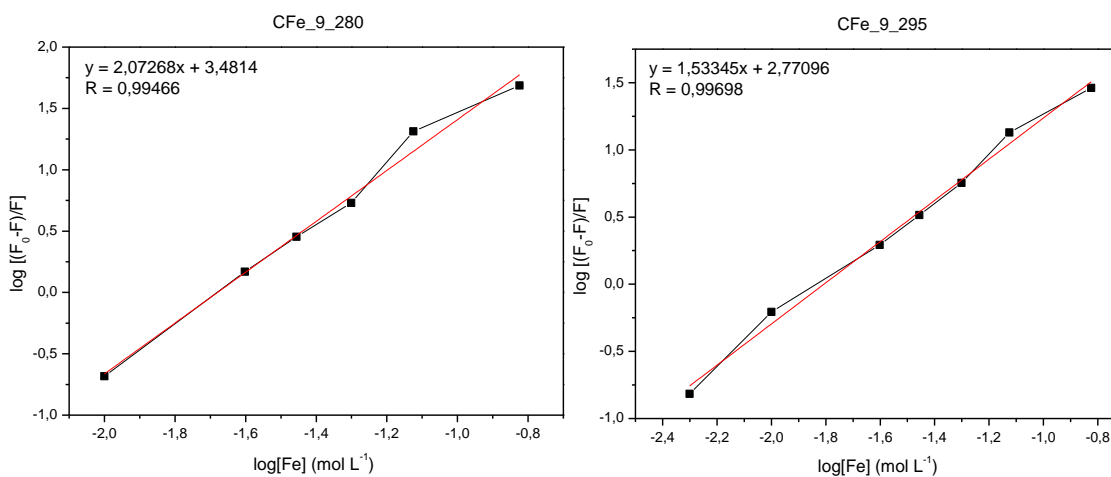


Figura 47. Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[Fe]$ para a caseína e o ferro em pH 9, e comprimentos de onda de 280 (A) e 295 nm (B).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

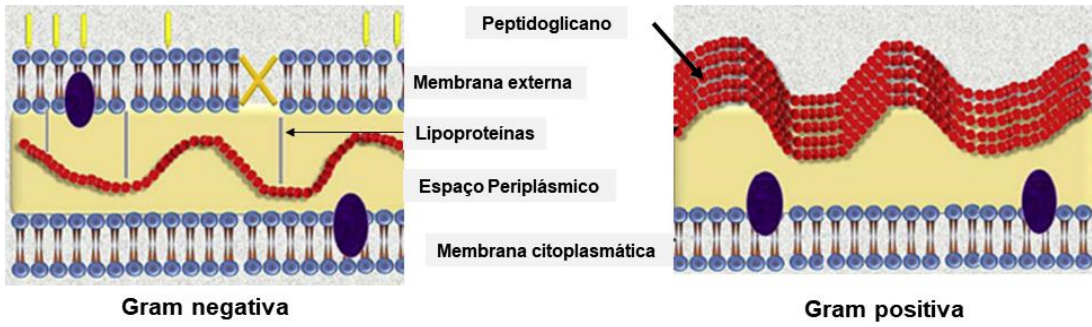
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

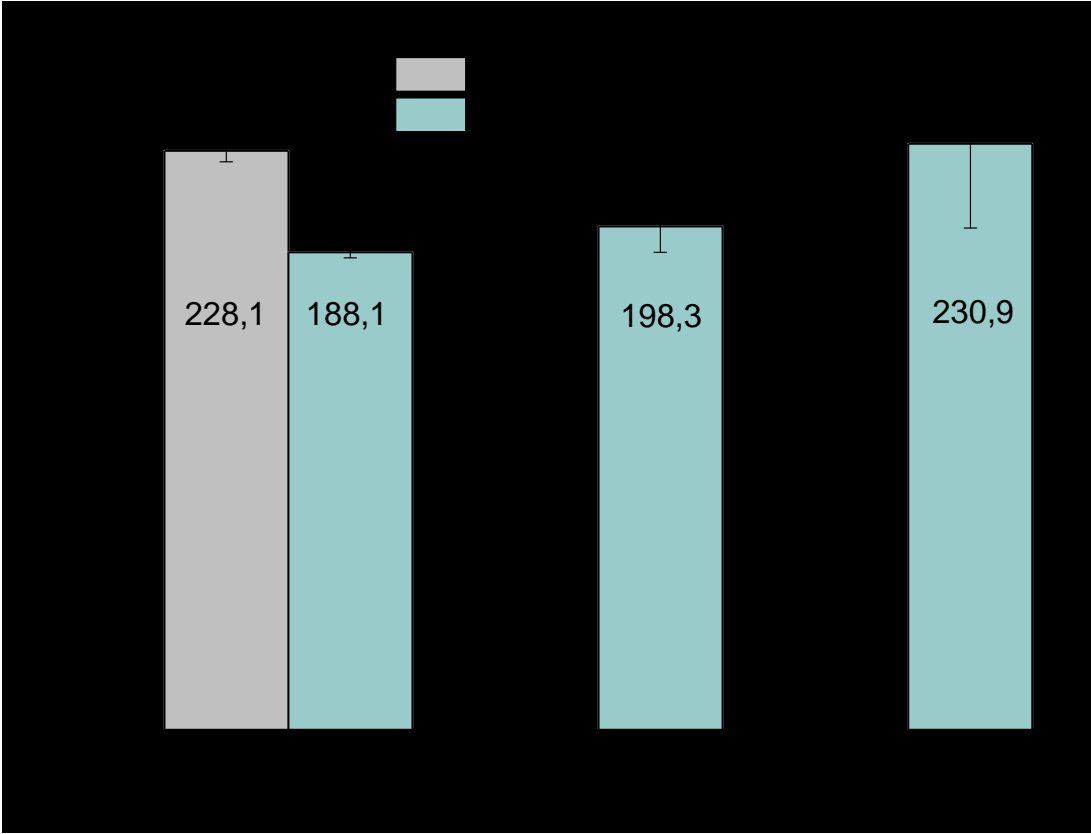
[REDACTED]

[REDACTED]

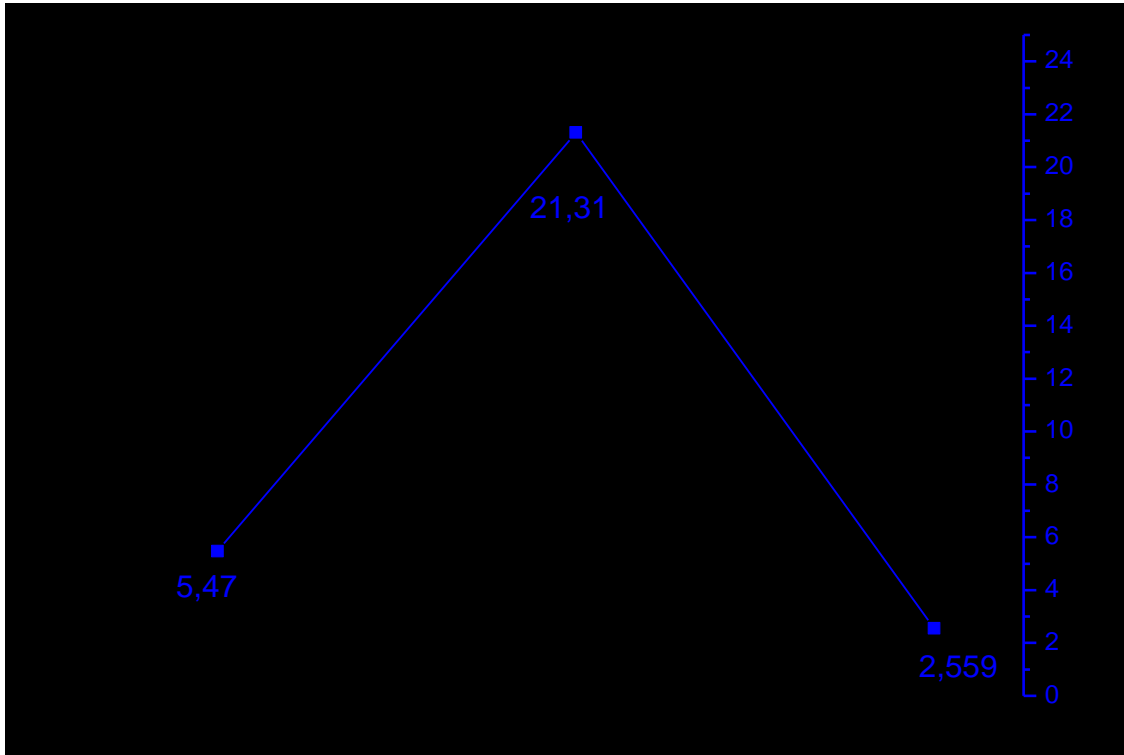
[REDACTED]



[REDACTED]

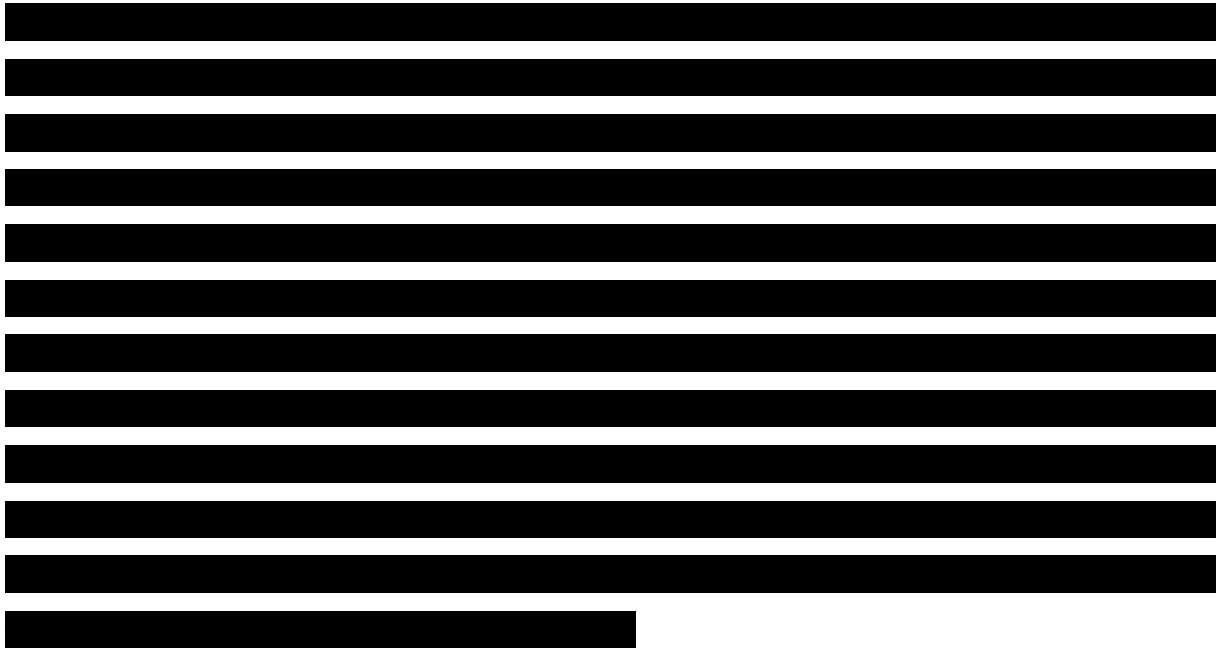
[REDACTED]

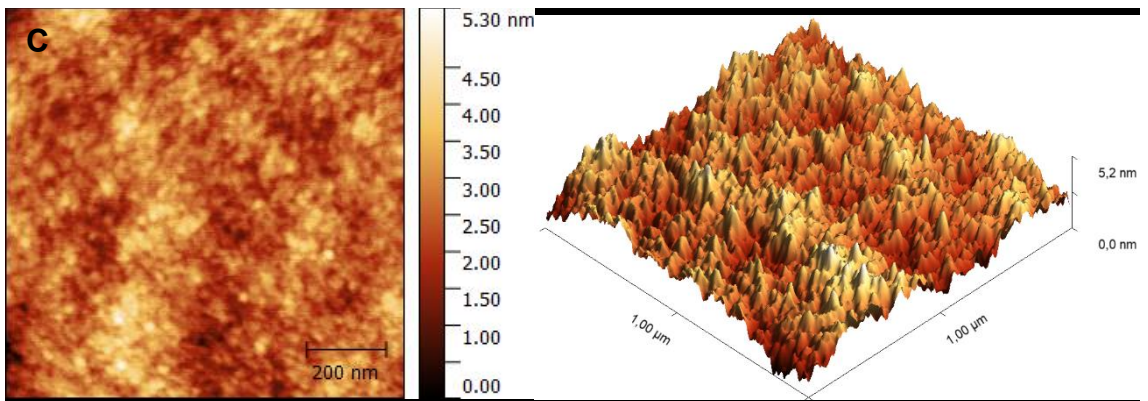
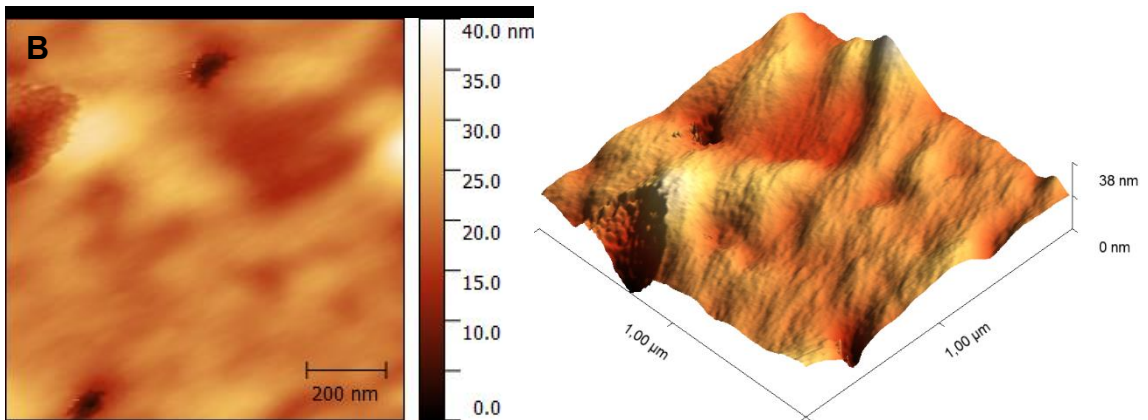
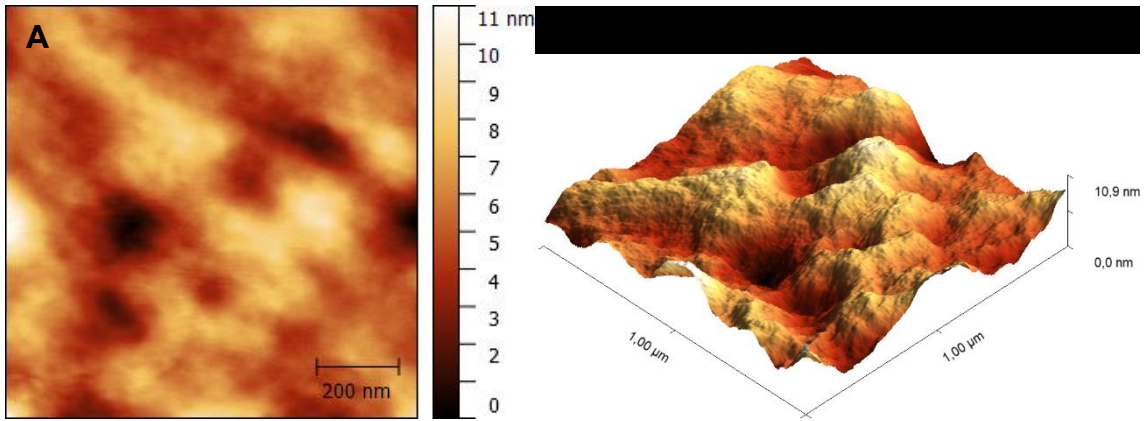


[Redacted text block]



Rugosidade da raiz quadrada média (RMS)  e altura média das estruturas superficiais  para filmes FSem, FC_7 e FCZn150_7





6.6.3.

Os filmes incorporados com as partículas (FCZn150_7) e sem adição de partículas (FSem) foram avaliados quanto a potencial aplicação na atividade antimicrobiana frente às bactérias já analisadas neste trabalho. O tempo de contato com o meio bacteriano foi de 24 e 48 h.

Os resultados para *Staphylococcus pseudintermedius* (Tabela 19) demonstraram que em ambos os tempos avaliados o filme sem modificação apresentou baixa atividade antimicrobiana, 0,74 e 3,95%, para os ensaios em 24 e 48 h, respectivamente. O que é esperado, visto nenhum agente que pudesse apresentar tal atividade (caseína e glicerol). Quando da modificação com as partículas contendo caseína e zinco, ocorreu um aumento significativo para ambos os tempos, porém o tempo de 48 h foi o melhor com uma atividade antibacteriana de 92,37%, em comparação a 71,25% dos ensaios em 24 h. Isto indica que os filmes têm potencial na aplicação local por períodos de 48 h.

Tabela 19. Atividade antimicrobiana dos filmes modificados com partículas de caseína e zinco (FCZn150_7) e sem modificação (FSem) frente a *Staphylococcus pseudintermedius* em 24 e 48 h.

Tempo (h)	FSem (%)	FCZn150_7 (%)	FCZn150_7 + Caseína (%)	FCZn150_7 + Zinco (%)
24	0,74	71,25	71,25	71,25
48	3,95	92,37	92,37	92,37

Os resultados para *Staphylococcus aureus* (Tabela 20) demonstraram que em ambos os tempos avaliados o filme sem modificação apresentou baixa atividade antimicrobiana, 0,74 e 3,95%, para os ensaios em 24 e 48 h, respectivamente. O que é esperado, visto nenhum agente que pudesse apresentar tal atividade (caseína e glicerol). Quando da modificação com as partículas contendo caseína e zinco, ocorreu um aumento significativo para ambos os tempos, porém o tempo de 48 h foi o melhor com uma atividade antibacteriana de 92,37%, em comparação a 71,25% dos ensaios em 24 h. Isto indica que os filmes têm potencial na aplicação local por períodos de 48 h.

[REDACTED]

BIBLIOGRAFIA

- (1) Karen A. Moriello. *Structure of the Skin in Dogs*. MSD MANUAL Veterinary Manual.
- (2) Garland, M. Introduction to Canine Skin and Dermatology. *Veterinary Nursing Journal* **2013**, *28* (4), 131–133. <https://doi.org/10.1111/vnj.12025>.
- (3) Sue Paterson. *Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2nd ed. 2008.; Blackwell Publishing: Nova Deli, India, 2008; Vol. 1.
- (4) A. HEINRICH, N.; EISENSCHENK, M.; G. HARVEY, R.; NUTTALL, T. *Skin Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed.; CRC Press: London, 2019.
- (5) Older, C. E.; Rodrigues Hoffmann, A.; Hoover, K.; Banovic, F. Characterization of Cutaneous Bacterial Microbiota from Superficial Pyoderma Forms in Atopic Dogs. *Pathogens* **2020**, *9* (8), 638. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080638>.
- (6) Penna, B.; Vargas, R.; Medeiros, L.; Martins, G. M.; Martins, R. R.; Lilenbaum, W. Species Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococci Isolated from Canine Otitis Externa. *Vet Dermatol* **2010**, *21* (3), 292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x>.
- (7) Ruscher, C.; Lübke-Becker, A.; Wleklinski, C.-G.; Şoba, A.; Wieler, L. H.; Walther, B. Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus Pseudintermedius Isolated from Clinical Samples of Companion Animals and Equidae. *Vet Microbiol* **2009**, *136* (1–2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.023>.
- (8) Devriese, L. A.; Vancanneyt, M.; Baele, M.; Vanechoutte, M.; De Graef, E.; Snauwaert, C.; Cleenwerck, I.; Dawyndt, P.; Swings, J.; Decostere, A.; Haesebrouck, F. Staphylococcus Pseudintermedius Sp. Nov., a Coagulase-Positive Species from Animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **2005**, *55* (4), 1569–1573. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63413-0>.
- (9) Bloom, P. Canine Superficial Bacterial Folliculitis: Current Understanding of Its Etiology, Diagnosis and Treatment. *The Veterinary Journal* **2014**, *199* (2), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.014>.
- (10) Fazakerley, J.; Nuttall, T.; Sales, D.; Schmidt, V.; Carter, S. D.; Hart, C. A.; McEwan, N. A. Staphylococcal Colonization of Mucosal and Lesional Skin Sites in Atopic and Healthy Dogs. *Vet Dermatol* **2009**, *20* (3), 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x>.
- (11) Bannoehr, J.; Guardabassi, L. *Staphylococcus Pseudintermedius* in the Dog: Taxonomy, Diagnostics, Ecology, Epidemiology and Pathogenicity. *Vet Dermatol* **2012**, *23* (4), 253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>.
- (12) Somayaji, R.; Priyantha, M. A. R.; Rubin, J. E.; Church, D. Human Infections Due to Staphylococcus Pseudintermedius, an Emerging Zoonosis of Canine Origin: Report of 24 Cases. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2016**, *85* (4), 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>.
- (13) Guimarães, L.; Teixeira, I. M.; da Silva, I. T.; Antunes, M.; Pesset, C.; Fonseca, C.; Santos, A. L.; Côrtes, M. F.; Penna, B. Epidemiologic Case Investigation on the Zoonotic Transmission of

- Methicillin-Resistant Staphylococcus Pseudintermedius among Dogs and Their Owners. *J Infect Public Health* **2023**, *16*, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.10.041>.
- (14) Riegel, P.; Jesel-Morel, L.; Laventie, B.; Boisset, S.; Vandenesch, F.; Prévost, G. Coagulase-Positive Staphylococcus Pseudintermedius from Animals Causing Human Endocarditis. *International Journal of Medical Microbiology* **2011**, *301* (3), 237–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.09.001>.
- (15) LaRocca, M. C.; Dermarkarian, C. R.; Ediriwickrema, L. S.; Tao, J. P. Staphylococcus Pseudintermedius of a Semicircular Facial Flap with Concomitant COVID-19 Infection. *Canadian Journal of Ophthalmology* **2023**, *58* (5), e221–e223. <https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2023.03.016>.
- (16) Stępień-Pyśniak, D.; Bertelloni, F.; Dec, M.; Cagnoli, G.; Pietras-Ożga, D.; Urban-Chmiel, R.; Ebani, V. V. Characterization and Comparison of Enterococcus Spp. Isolates from Feces of Healthy Dogs and Urine of Dogs with UTIs. *Animals* **2021**, *11* (10), 2845. <https://doi.org/10.3390/ani11102845>.
- (17) KuKanich, K. S.; Lubbers, B. V. Review of Enterococci Isolated from Canine and Feline Urine Specimens from 2006 to 2011. *J Am Anim Hosp Assoc* **2015**, *51* (3), 148–154. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6070>.
- (18) Fisher, K.; Phillips, C. The Ecology, Epidemiology and Virulence of Enterococcus. *Microbiology (N Y)* **2009**, *155* (6), 1749–1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>.
- (19) Wood, M. W.; Lepold, A.; Tesfamichael, D.; Lasarev, M. R. Risk Factors for Enterococcal Bacteriuria in Dogs: A Retrospective Study. *J Vet Intern Med* **2020**, *34* (6), 2447–2453. <https://doi.org/10.1111/jvim.15916>.
- (20) Rajkumari, N.; Mathur, P.; Misra, M. *Soft Tissue and Wound Infections Due to Enterococcus Spp. among Hospitalized Trauma Patients in a Developing Country*; 2014. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.145253>.
- (21) Ioannou P, C. D. M. S. S. G. K. D. *Mixed Skin and Soft Tissue Infection Caused by Rhodotorula Glutinis and Enterococcus Faecalis in a Diabetic Patient: A Case Report*; 2017; pp 211–214.
- (22) Abdel-Moein, K. A.; El-Hariri, M. D.; Wasfy, M. O.; Samir, A. Occurrence of Ampicillin-Resistant Enterococcus Faecium Carrying Esp Gene in Pet Animals: An Upcoming Threat for Pet Lovers. *J Glob Antimicrob Resist* **2017**, *9*, 115–117. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.011>.
- (23) Breyer, G. M.; Saggin, B. F.; de Carli, S.; da Silva, M. E. R. J.; da Costa, M. M.; Brenig, B.; Azevedo, V. A. de C.; Cardoso, M. R. de I.; Siqueira, F. M. Virulent Potential of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Staphylococcus Pseudintermedius in Dogs. *Acta Trop* **2023**, *242*, 106911. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106911>.
- (24) Cain, C. L. Antimicrobial Resistance in Staphylococci in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **2013**, *43* (1), 19–40. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.09.003>.
- (25) Wendlandt, S.; Shen, J.; Kadlec, K.; Wang, Y.; Li, B.; Zhang, W.-J.; Feßler, A. T.; Wu, C.; Schwarz, S. Multidrug Resistance Genes in Staphylococci from Animals That Confer Resistance to

- Critically and Highly Important Antimicrobial Agents in Human Medicine. *Trends Microbiol* **2015**, *23* (1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.002>.
- (26) Skov, R.; Varga, A.; Matuschek, E.; Åhman, J.; Bemis, D.; Bengtsson, B.; Sunde, M.; Humphries, R.; Westblade, L.; Guardabassi, L.; Kahlmeter, G. EUCAST Disc Diffusion Criteria for the Detection of MecA-Mediated β -Lactam Resistance in *Staphylococcus Pseudintermedius*: Oxacillin versus Cefoxitin. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, *26* (1), 122.e1-122.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.002>.
- (27) Nomoto, H.; Kutsuna, S.; Nakamura, K.; Nakamoto, T.; Shimomura, A.; Hirakawa, T.; Kinoshita, N.; Hayakawa, K.; Nagashima, M.; Ohmagari, N. *Totally Implantable Venous Access Port Infection Caused by Staphylococcus Pseudintermedius: Possible Transmission from a Companion Dog to a Human*; 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.07.011>.
- (28) Moses, I. B.; Esimone, C. O.; Iroha, I. R.; Rubin, J. E.; Sniatynsky, M. K.; Ribeiro, Á. C. da S.; Santos, F. F.; Cayo da Silva, R.; Gales, A. C. Antibiotypes and High Frequency of Toxin Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* from Nares of Dogs and Dog Guardians in Nigeria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2022**, *89*, 101870. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101870>.
- (29) Phophi, L.; Abouelkhair, M. A.; Jones, R.; Zehr, J.; Kania, S. A. Temporal Changes in Antibiotic Resistance and Population Structure of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* between 2010 and 2021 in the United States. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2023**, *100*, 102028. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102028>.
- (30) Wegener, A.; Broens, E. M.; Zomer, A.; Spaninks, M.; Wagenaar, J. A.; Duim, B. Comparative Genomics of Phenotypic Antimicrobial Resistances in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* of Canine Origin. *Vet Microbiol* **2018**, *225*, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.013>.
- (31) Moodley, A.; Damborg, P.; Nielsen, S. S. Antimicrobial Resistance in Methicillin Susceptible and Methicillin Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* of Canine Origin: Literature Review from 1980 to 2013. *Vet Microbiol* **2014**, *171* (3–4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.008>.
- (32) Ramos, S.; Silva, V.; Dapkevicius, M.; Igrejas, G.; Poeta, P. Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms* **2020**, *8* (8), 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>.
- (33) Miller, W. R.; Murray, B. E.; Rice, L. B.; Arias, C. A. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect Dis Clin North Am* **2020**, *34* (4), 751–771. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.08.004>.
- (34) Fiore, E.; Van Tyne, D.; Gilmore, M. S. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr* **2019**, *7* (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>.
- (35) Yang, H.; Wang, W.-S.; Tan, Y.; Zhang, D.-J.; Wu, J.-J.; Lei, X. Investigation and Analysis of the Characteristics and Drug Sensitivity of Bacteria in Skin Ulcer Infections. *Chinese Journal of Traumatology* **2017**, *20* (4), 194–197. <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2016.09.005>.

- (36) Xie, T.; Lin, J.; Lin, D.; Zhang, D.; Xu, X.; Zhu, N.; Lin, J. In Vitro and in Vivo Antibacterial Studies of Volatile Oil from *Atractylodis Rhizoma* against *Staphylococcus Pseudintermedius* and Multidrug Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* Strains from Canine Pyoderma. *J Ethnopharmacol* **2024**, *319*, 117326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117326>.
- (37) Jantorn, P.; Tipmanee, V.; Wanna, W.; Prapasarakul, N.; Visutthi, M.; Sotthibandhu, D. S. Potential Natural Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Piper Betle L. against *Staphylococcus Pseudintermedius* and Methicillin-Resistant Strains. *J Ethnopharmacol* **2023**, *317*, 116820. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116820>.
- (38) Shabbir, J.; Khurshid, Z.; Farooqui, W.; Zafar, M. S.; Sarwar, H.; Imran, E.; ul Hasan, S. M. In-Vitro Antibacterial Efficacy of Propolis against *E. Faecalis* as Compared to Other Intracanal Medicaments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Herb Med* **2023**, *40*, 100673. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100673>.
- (39) Singh, D.; Tiwari, A.; Singh, R. P.; Singh, A. K. Clove Bud Extract Mediated Green Synthesis of Bimetallic Ag–Fe Nanoparticles: Antimicrobial, Antioxidant and Dye Adsorption Behavior and Mechanistic Insights of Metal Ion Reduction. *Mater Chem Phys* **2024**, *311*, 128529. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.128529>.
- (40) Azharuddin, M.; Zhu, G. H.; Das, D.; Ozgur, E.; Uzun, L.; Turner, A. P. F.; Patra, H. K. A Repertoire of Biomedical Applications of Noble Metal Nanoparticles. *Chemical Communications* **2019**, *55* (49), 6964–6996. <https://doi.org/10.1039/C9CC01741K>.
- (41) de Lacerda Coriolano, D.; de Souza, J. B.; Bueno, E. V.; Medeiros, S. M. de F. R.; Cavalcanti, I. D. L.; Cavalcanti, I. M. F. Antibacterial and Antibiofilm Potential of Silver Nanoparticles against Antibiotic-Sensitive and Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. *Brazilian Journal of Microbiology* **2021**, *52* (1), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00406-x>.
- (42) Huang, X.; Li, T.; Zhang, X.; Deng, J.; Yin, X. Bimetallic Palladium@copper Nanoparticles: Lethal Effect on the Gram-Negative Bacterium *Pseudomonas Aeruginosa*. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *129*, 112392. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112392>.
- (43) Mohammed Sadiq, I.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Studies on Effect of TiO₂ Nanoparticles on Growth and Membrane Permeability of *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, and *Bacillus Subtilis*. *Curr Nanosci* **2010**, *6* (4), 381–387. <https://doi.org/10.2174/157341310791658973>.
- (44) Alemán, J.; Chadwick, A. V.; He, J.; Hess, M.; Horie, K.; Jones, R. G.; Kratochvíl, P.; Meisel, I.; Mita, I.; Moad, G.; Penczek, S.; Stepto, R. F. T. Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Sols, Gels, Networks, and Inorganic-Organic Hybrid Materials (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry* **2007**, *79* (10), 1801–1829. <https://doi.org/10.1351/pac200779101801>.
- (45) COUTO, G. G. DO. Nanopartículas de Níquel: Síntese, Caracterização, Propriedades e Estudo de Sua Utilização Como Catalisadores Na Obtenção de Nanotubos de Carbono, Universidade Federal do Paraná, 2006.
- (46) Correia, G. B. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Níquel Para Óptica Não Linear, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

- (47) Assis, L. M. de; Zavareze, E. da R.; Prentice-Hernández, C.; Souza-Soares, L. A. de. Revisão: Características de Nanopartículas e Potenciais Aplicações Em Alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* **2012**, 15 (2), 99–109. <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000004>.
- (48) Kapoor, D. U.; Patel, R. J.; Gaur, M.; Parikh, S.; Prajapati, B. G. Metallic and Metal Oxide Nanoparticles in Treating Pseudomonas Aeruginosa Infections. *J Drug Deliv Sci Technol* **2024**, 91, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105290>.
- (49) Hosokawa, M.; Nogi, K.; Naito, M.; Yokoyama, T. *Nanoparticle Technology Handbook*; 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53122-3.X5001-6>.
- (50) Aslam, H.; Shukrullah, S.; Naz, M. Y.; Fatima, H.; Hussain, H.; Ullah, S.; Assiri, M. A. Current and Future Perspectives of Multifunctional Magnetic Nanoparticles Based Controlled Drug Delivery Systems. *J Drug Deliv Sci Technol* **2021**, No. October, 102946. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102946>.
- (51) Chowdhury, N. K.; Deepika; Choudhury, R.; Sonawane, G. A.; Mavinamar, S.; Lyu, X.; Pandey, R. P.; Chang, C. M. Nanoparticles as an Effective Drug Delivery System in COVID-19. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, 143 (September), 112162. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112162>.
- (52) Kandasamy, G.; Maity, D. Multifunctional Theranostic Nanoparticles for Biomedical Cancer Treatments - A Comprehensive Review. *Materials Science and Engineering C* **2021**, 127 (March), 112199. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112199>.
- (53) Li, X.; Li, W.; Wang, M.; Liao, Z. Magnetic Nanoparticles for Cancer Theranostics: Advances and Prospects. *Journal of Controlled Release* **2021**, 335 (February), 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.042>.
- (54) Moskvín, M.; Babič, M.; Reis, S.; Cruz, M. M.; Ferreira, L. P.; Carvalho, M. D.; Lima, S. A. C.; Horák, D. Biological Evaluation of Surface-Modified Magnetic Nanoparticles as a Platform for Colon Cancer Cell Theranostics. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2018**, 161, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.034>.
- (55) Shetty, A.; Chandra, S. Inorganic Hybrid Nanoparticles in Cancer Theranostics: Understanding Their Combinations for Better Clinical Translation. *Mater Today Chem* **2020**, 18, 100381. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100381>.
- (56) ROSA, T. Obtenção de Nanopartículas de Níquel Suportadas Em Sílica via Pulverização Catódica : Preparação e Atividade Catalítica, Universidade de São Paulo, 2016.
- (57) Ma, J.; An, W.; Xu, Q.; Fan, Q.; Wang, Y. Antibacterial Casein-Based ZnO Nanocomposite Coatings with Improved Water Resistance Crafted via Double in Situ Route. *Prog Org Coat* **2019**, 134 (May), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.05.007>.
- (58) Somu, P.; Paul, S. Casein Based Biogenic-Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Simultaneously Decontaminate Heavy Metals, Dyes, and Pathogenic Microbes: A Rational Strategy for Wastewater Treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2018**, 93 (10), 2962–2976. <https://doi.org/10.1002/jctb.5655>.

- (59) Nadar, S. S.; Kelkar, R. K.; Pise, P. V.; Patil, N. P.; Patil, S. P.; Chaubal-Durve, N. S.; Bhange, V. P.; Tiwari, M. S.; Patil, P. D. The Untapped Potential of Magnetic Nanoparticles for Forensic Investigations: A Comprehensive Review. *Talanta* **2021**, *230* (November 2020), 122297. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122297>.
- (60) Liu, C.; Wu, S.; Yan, Y.; Dong, Y.; Shen, X.; Huang, C. Application of Magnetic Particles in Forensic Science. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *121*, 115674. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115674>.
- (61) Anuradha; Bhatia, T. Novel Nanomaterials in Forensic Investigations: A Review. *Mater Today Proc* **2021**, No. xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.07.466>.
- (62) Al-Hetlani, E.; Amin, M. O.; Madkour, M.; D’Cruz, B. Forensic Determination of Pesticides in Human Serum Using Metal Ferrites Nanoparticles and SALDI-MS. *Talanta* **2021**, *221* (August 2020), 121556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121556>.
- (63) Mishra, A.; Pradhan, D.; Halder, J.; Biswasroy, P.; Rai, V. K.; Dubey, D.; Kar, B.; Ghosh, G.; Rath, G. Metal Nanoparticles against Multi-Drug-Resistance Bacteria. *J Inorg Biochem* **2022**, *237*, 111938. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111938>.
- (64) Alphanđery, E. Iron Oxide Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Drug Discov Today* **2020**, *25* (1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.020>.
- (65) Jabli, M.; Al-Ghamdi, Y. O.; Sebeia, N.; Almalki, S. G.; Alturaiki, W.; Khaled, J. M.; Mubarak, A. S.; Algethami, F. K. Green Synthesis of Colloid Metal Oxide Nanoparticles Using Cynomorium Coccineum: Application for Printing Cotton and Evaluation of the Antimicrobial Activities. *Mater Chem Phys* **2020**, *249*, 123171. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123171>.
- (66) Gudkov, S. V.; Burmistrov, D. E.; Serov, D. A.; Rebezov, M. B.; Semenova, A. A.; Lisitsyn, A. B. Do Iron Oxide Nanoparticles Have Significant Antibacterial Properties? *Antibiotics* **2021**, *10* (7), 884. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070884>.
- (67) Navaf, M.; Sunooj, K. V.; Aaliya, B.; Akhila, P. P.; Sudheesh, C.; Mir, S. A.; George, J. Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Functional and Antimicrobial Activity of Starch Nanocomposite Film; A Review. *Measurement: Food* **2023**, *11*, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.meafoo.2023.100099>.
- (68) Chaudhary, A.; Kumar, N.; Kumar, R.; Salar, R. K. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized from Aloe Vera Peel Extract. *SN Appl Sci* **2019**, *1* (1), 136. <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0144-2>.
- (69) Dizaj, S. M.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M. H.; Adibkia, K. Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxide Nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *44*, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>.
- (70) Mařátková, O.; Michailidu, J.; Miřkovská, A.; Kolouchová, I.; Masák, J.; Čejková, A. Antimicrobial Properties and Applications of Metal Nanoparticles Biosynthesized by Green Methods. *Biotechnol Adv* **2022**, *58*, 107905. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107905>.

- (71) Xu, W.; Yang, T.; Liu, S.; Du, L.; Chen, Q.; Li, X.; Dong, J.; Zhang, Z.; Lu, S.; Gong, Y.; Zhou, L.; Liu, Y.; Tan, X. Insights into the Synthesis, Types and Application of Iron Nanoparticles: The Overlooked Significance of Environmental Effects. *Environ Int* **2022**, *158*, 106980. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106980>.
- (72) David Medina Cruz, Ebrahim Mostafavi, A. V.-C.; Barabadi, H.; Shah, V.; L., J.; Cholula-Díaz; Guisbiers, G.; Webster, T. J. Green Nanotechnology-Based Zinc Oxide (ZnO) Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *JPhys Materials* **2020**, *3*.
- (73) Iqbal, A.; Iqbal, K.; Li, B.; Gong, D.; Qin, W. Recent Advances in Iron Nanoparticles: Preparation, Properties, Biological and Environmental Application. *J Nanosci Nanotechnol* **2017**, *17* (7), 4386–4409. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.14196>.
- (74) Stefaniuk, M.; Oleszczuk, P.; Ok, Y. S. Review on Nano Zerovalent Iron (NZVI): From Synthesis to Environmental Applications. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *287*, 618–632. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.046>.
- (75) Zhao, X.; Liu, W.; Cai, Z.; Han, B.; Qian, T.; Zhao, D. An Overview of Preparation and Applications of Stabilized Zero-Valent Iron Nanoparticles for Soil and Groundwater Remediation. *Water Res* **2016**, *100*, 245–266. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.019>.
- (76) Yan, W.; Lien, H.-L.; Koel, B. E.; Zhang, W. Iron Nanoparticles for Environmental Clean-up: Recent Developments and Future Outlook. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2013**, *15* (1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/C2EM30691C>.
- (77) Li, X.; Elliott, D. W.; Zhang, W. Zero-Valent Iron Nanoparticles for Abatement of Environmental Pollutants: Materials and Engineering Aspects. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **2006**, *31* (4), 111–122. <https://doi.org/10.1080/10408430601057611>.
- (78) Li, S.; Yan, W.; Zhang, W. Solvent-Free Production of Nanoscale Zero-Valent Iron (NZVI) with Precision Milling. *Green Chemistry* **2009**, *11* (10), 1618. <https://doi.org/10.1039/b913056j>.
- (79) Varghese, B.; Kurian, M.; Krishna, S.; Athira, T. S. Biochemical Synthesis of Copper Nanoparticles Using Zingiber Officinale and Curcuma Longa: Characterization and Antibacterial Activity Study. *Mater Today Proc* **2020**, *25*, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.476>.
- (80) Ahmad, W.; Kalra, D. Green Synthesis, Characterization and Anti Microbial Activities of ZnO Nanoparticles Using Euphorbia Hirta Leaf Extract. *J King Saud Univ Sci* **2020**, *32* (4), 2358–2364. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.03.014>.
- (81) Manik, U. P.; Nande, A.; Raut, S.; Dhoble, S. J. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Leaf Extraction of Artocarpus Heterophyllus and Azadirachta Indica. *Results in Materials* **2020**, *6* (March), 100086. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2020.100086>.
- (82) Balasubramanian, S.; Kala, S. M. J.; Pushparaj, T. L. Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles Using Jasminum Auriculatum Leaf Extract and Their Catalytic, Antimicrobial and Anticancer Activities. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *57* (May 2019), 101620. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101620>.

- (83) Sasidharan, D.; Namitha, T. R.; Johnson, S. P.; Jose, V.; Mathew, P. Synthesis of Silver and Copper Oxide Nanoparticles Using Myristica Fragrans Fruit Extract: Antimicrobial and Catalytic Applications. *Sustain Chem Pharm* **2020**, *16* (April), 100255. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100255>.
- (84) Ameen, F.; AlYahya, S.; Govarthanan, M.; ALjahdali, N.; Al-Enazi, N.; Alsamhary, K.; Alshehri, W. A.; Alwakeel, S. S.; Alharbi, S. A. Soil Bacteria *Cupriavidus* Sp. Mediates the Extracellular Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles. *J Mol Struct* **2020**, *1202*, 127233. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127233>.
- (85) Mathivanan, K.; Selva, R.; Chandirika, J. U.; Govindarajan, R. K.; Srinivasan, R.; Annadurai, G.; Duc, P. A. Biologically Synthesized Silver Nanoparticles against Pathogenic Bacteria: Synthesis, Calcination and Characterization. *Biocatal Agric Biotechnol* **2019**, *22* (October), 101373. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101373>.
- (86) Saravanan, M.; Barik, S. K.; MubarakAli, D.; Prakash, P.; Pugazhendhi, A. Synthesis of Silver Nanoparticles from *Bacillus Brevis* (NCIM 2533) and Their Antibacterial Activity against Pathogenic Bacteria. *Microb Pathog* **2018**, *116* (November 2017), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.038>.
- (87) Rajivgandhi, G.; Maruthupandy, M.; Muneeswaran, T.; Ramachandran, G.; Manoharan, N.; Quero, F.; Anand, M.; Song, J. M. Biologically Synthesized Copper Oxide Nanoparticles Enhanced Intracellular Damage in Ciprofloxacin Resistant ESBL Producing Bacteria. *Microb Pathog* **2019**, *127* (December 2018), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.017>.
- (88) Amutha, C.; Thanikaikarasan, S.; Ramadas, V.; Natarajan, B. Structural, Morphological and Optical Properties of Albumen Mediated ZnO Nanoparticles. *Optik (Stuttg)* **2015**, *126* (24), 5748–5752. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.09.085>.
- (89) Thangaraj, P.; Rajan, J.; Durai, S.; Kumar, S.; Ratnaphani, A.; Neri, G. The Role of Albumen (Egg White) in Controlled Particle Size and Electrical Conductivity Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles. *Vacuum* **2011**, *86* (2), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2011.05.001>.
- (90) Prakash, T.; Jayaprakash, R.; Raj, D. S.; Kumar, S.; Donato, N.; Spadaro, D.; Neri, G. Sensing Properties of ZnO Nanoparticles Synthesized by Using Albumen as a Biotemplate for Acetic Acid Monitoring in Aqueous Mixture. *Sens Actuators B Chem* **2013**, *176*, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.011>.
- (91) Vijayakumar, T. S.; Mahboob, S.; Bupesh, G.; Vasanth, S.; Al-Ghanim, K. A.; Al-Misned, F.; Govindarajan, M. Facile Synthesis and Biophysical Characterization of Egg Albumen-Wrapped Zinc Oxide Nanoparticles: A Potential Drug Delivery Vehicles for Anticancer Therapy. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *60* (August), 102015. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102015>.
- (92) Agarwal, H.; Venkat Kumar, S.; Rajeshkumar, S. A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles – An Eco-Friendly Approach. *Resource-Efficient Technologies* **2017**, *3* (4), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.refit.2017.03.002>.

- (93) Saif, S.; Tahir, A.; Chen, Y. Green Synthesis of Iron Nanoparticles and Their Environmental Applications and Implications. *Nanomaterials* **2016**, *6* (11), 209. <https://doi.org/10.3390/nano6110209>.
- (94) Zhao, Z.; Corredig, M. Colloidal Properties of Casein Micelles Suspensions as a Function of PH during Concentration by Osmotic Stressing. *Food Hydrocoll* **2016**, *60*, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.016>.
- (95) Fatemi, M.; Mollania, N.; Momeni-Moghaddam, M.; Sadeghifar, F. Extracellular Biosynthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles by *Bacillus Cereus* Strain HMH1: Characterization and in Vitro Cytotoxicity Analysis on MCF-7 and 3T3 Cell Lines. *J Biotechnol* **2018**, *270* (July 2017), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.021>.
- (96) Mukherjee, K.; Gupta, R.; Kumar, G.; Kumari, S.; Biswas, S.; Padmanabhan, P. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology Synthesis of Silver Nanoparticles by *Bacillus Clausii* and Computational Profiling of Nitrate Reductase Enzyme Involved in Production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **2018**, *16* (2), 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.004>.
- (97) Cruz, D. M.; Mostafavi, E.; Vernet-Crua, A.; Barabadi, H.; Shah, V.; Cholula-Díaz, J. L.; Guisbiers, G.; Webster, T. J. Green Nanotechnology-Based Zinc Oxide (ZnO) Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *JPhys Materials* **2020**, *3* (3). <https://doi.org/10.1088/2515-7639/ab8186>.
- (98) Elzoghby, A. O.; Abo El-Fotoh, W. S.; Elgindy, N. A. Casein-Based Formulations as Promising Controlled Release Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2011**, *153* (3), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.010>.
- (99) Horne, D. S. Casein Structure, Self-Assembly and Gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2002**, *7* (5–6), 456–461. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00082-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00082-1).
- (100) Horne, D. S. Steric Stabilization and Casein Micelle Stability. *J Colloid Interface Sci* **1986**, *111* (1), 250–260. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90024-X).
- (101) Wusigale; Liang, L.; Luo, Y. Casein and Pectin: Structures, Interactions, and Applications. *Trends Food Sci Technol* **2020**, *97*, 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.027>.
- (102) Livney, Y. D. Milk Proteins as Vehicles for Bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2010**, *15* (1–2), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>.
- (103) Morr, C. V. Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles. *J Dairy Sci* **1967**, *50* (11), 1744–1751. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87710-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87710-5).
- (104) Creamer, L. K.; Richardson, T.; Parry, D. A. D. Secondary Structure of Bovine AS1- and β -Casein in Solution. *Arch Biochem Biophys* **1981**, *211* (2), 689–696. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90505-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90505-1).
- (105) Bhat, M. Y.; Dar, T. A.; Singh, L. R. Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. In *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*; InTech, 2016. <https://doi.org/10.5772/64187>.

- (106) Swaisgood, H. E. Chemistry of the Caseins. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*; Springer US: Boston, MA, 2003; pp 139–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_3.
- (107) Schick, M. J. Surface and Colloid Science, Vol. 5, E. Matijevic, Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1972. 329 Pp. \$22.50. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* **1973**, *11* (5), 343–344. <https://doi.org/10.1002/pol.1973.130110510>.
- (108) Fox, P. F.; Uniacke-Lowe, T.; McSweeney, P. L. H.; O'Mahony, J. A. *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>.
- (109) Qi, P. X. Studies of Casein Micelle Structure: The Past and the Present. *Lait* **2007**, *87* (4–5), 363–383. <https://doi.org/10.1051/lait:2007026>.
- (110) Elzoghby, A. O.; Abo El-Fotoh, W. S.; Elgindy, N. A. Casein-Based Formulations as Promising Controlled Release Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2011**, *153* (3), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.010>.
- (111) Guha, S.; Majumder, K.; Mine, Y. Egg Proteins. In *Encyclopedia of Food Chemistry*; Elsevier, 2019; pp 74–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21603-X>.
- (112) Chay Pak Ting, B. P.; Pouliot, Y.; Gauthier, S. F.; Mine, Y. Fractionation of Egg Proteins and Peptides for Nutraceutical Applications. In *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*; Elsevier, 2013; pp 595–618. <https://doi.org/10.1533/9780857090751.2.595>.
- (113) Stein, P. E.; Leslie, A. G. W.; Finch, J. T.; Carrell, R. W. Crystal Structure of Uncleaved Ovalbumin at 1.95 Å Resolution. *J Mol Biol* **1991**, *221* (3), 941–959. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80185-W](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80185-W).
- (114) Abd El-Salam, M. H.; El-Shibiny, S. Natural Biopolymers as Nanocarriers for Bioactive Ingredients Used in Food Industries. In *Encapsulations*; Elsevier, 2016; pp 793–829. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804307-3.00019-3>.
- (115) Croguennec, T.; Nau, F.; Brulé, G. Influence of PH and Salts on Egg White Gelation. *J Food Sci* **2002**, *67* (2), 608–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10646.x>.
- (116) Sharif, M. K.; Saleem, M.; Javed, K. Food Materials Science in Egg Powder Industry. In *Role of Materials Science in Food Bioengineering*; Elsevier, 2018; pp 505–537. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00015-2>.
- (117) Vijayakumar, T. S.; Mahboob, S.; Bupesh, G.; Vasanth, S.; Al-Ghanim, K. A.; Al-Misned, F.; Govindarajan, M. Facile Synthesis and Biophysical Characterization of Egg Albumen-Wrapped Zinc Oxide Nanoparticles: A Potential Drug Delivery Vehicles for Anticancer Therapy. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *60*, 102015. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102015>.
- (118) Prakash, T.; Jayaprakash, R.; Sathya Raj, D.; Kumar, S.; Donato, N.; Spadaro, D.; Neri, G. Sensing Properties of ZnO Nanoparticles Synthesized by Using Albumen as a Biotemplate for Acetic Acid Monitoring in Aqueous Mixture. *Sens Actuators B Chem* **2013**, *176*, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.011>.

- (119) Thangaraj, P.; Rajan, J.; Durai, S.; Kumar, S.; RatnaPhani, A.; Neri, G. The Role of Albumen (Egg White) in Controlled Particle Size and Electrical Conductivity Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles. *Vacuum* **2011**, *86* (2), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2011.05.001>.
- (120) Sambath, K.; Saroja, M.; Venkatachalam, M.; Rajendran, K.; Muthukumarasamy, N. Morphology Controlled Synthesis of ZnO Nanostructures by Varying PH. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **2012**, *23* (2), 431–436. <https://doi.org/10.1007/s10854-011-0507-6>.
- (121) *Fennema's Food Chemistry, Fifth Edition*; CRC Press, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315372914>.
- (122) Wang, Y.; Zhang, L.; Wang, P.; Xu, X.; Zhou, G. PH-Shifting Encapsulation of Curcumin in Egg White Protein Isolate for Improved Dispersity, Antioxidant Capacity and Thermal Stability. *Food Research International* **2020**, *137*, 109366. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109366>.
- (123) Xu, Y.-T.; Wang, Y.-H.; Chen, F.-P.; Tang, C.-H. Whether Ovalbumin Performs as a Particulate or Polymeric Emulsifier Is Largely Determined by PH. *Food Hydrocoll* **2020**, *103*, 105694. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105694>.
- (124) Bhat, M. Y.; Dar, T. A.; Singh, L. R. Casein Proteins: Structural and Functional Aspects. In *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects*; InTech, 2016. <https://doi.org/10.5772/64187>.
- (125) Sinaga, H.; Bansal, N.; Bhandari, B. Effects of Milk PH Alteration on Casein Micelle Size and Gelation Properties of Milk. *Int J Food Prop* **2017**, *20* (1), 179–197. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1152480>.
- (126) Ouyang, Y.; Chen, L.; Qian, L.; Lin, X.; Fan, X.; Teng, H.; Cao, H. Fabrication of Caseins Nanoparticles to Improve the Stability of Cyanidin 3-O-Glucoside. *Food Chem* **2020**, *317*, 126418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126418>.
- (127) Salehi, N.; Mirjalili, B. B. F. Nano-Ovalbumin: A Green Biocatalyst for Biomimetic Synthesis of Tetrahydrodipyrazolo Pyridines in Water. *Research on Chemical Intermediates* **2018**, *44* (11), 7065–7077. <https://doi.org/10.1007/s11164-018-3542-6>.
- (128) Vijayakumar, T. S.; Mahboob, S.; Bupesh, G.; Vasanth, S.; Al-Ghanim, K. A.; Al-Misned, F.; Govindarajan, M. Facile Synthesis and Biophysical Characterization of Egg Albumen-Wrapped Zinc Oxide Nanoparticles: A Potential Drug Delivery Vehicles for Anticancer Therapy. *J Drug Deliv Sci Technol* **2020**, *60*, 102015. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102015>.
- (129) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introduction to Spectroscopy*, 5th ed.; 2015.
- (130) Thangaraj, P.; Rajan, J.; Durai, S.; Kumar, S.; RatnaPhani, A.; Neri, G. The Role of Albumen (Egg White) in Controlled Particle Size and Electrical Conductivity Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles. *Vacuum* **2011**, *86* (2), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2011.05.001>.
- (131) Prakash, T.; Jayaprakash, R.; Sathya Raj, D.; Kumar, S.; Donato, N.; Spadaro, D.; Neri, G. Sensing Properties of ZnO Nanoparticles Synthesized by Using Albumen as a Biotemplate for Acetic

- Acid Monitoring in Aqueous Mixture. *Sens Actuators B Chem* **2013**, *176*, 560–568.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.011>.
- (132) Dong, A.; Meyer, J. D.; Brown, J. L.; Manning, M. C.; Carpenter, J. F. Comparative Fourier Transform Infrared and Circular Dichroism Spectroscopic Analysis of A1-Proteinase Inhibitor and Ovalbumin in Aqueous Solution. *Arch Biochem Biophys* **2000**, *383* (1), 148–155.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2054>.
- (133) GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; FRIEDMAN, M.; CHANG, SH. -M. Simultaneous Differential Scanning Calorimetry, X-ray Diffraction and FTIR Spectrometry in Studies of Ovalbumin Denaturation. *Int J Pept Protein Res* **1995**, *45* (3), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1995.tb01486.x>.
- (134) Hmamouchi, S.; El Yacoubi, A.; El Idrissi, B. C. Using Egg Ovalbumin to Synthesize Pure α -Fe₂O₃ and Cobalt Doped α -Fe₂O₃: Structural, Morphological, Optical and Photocatalytic Properties. *Heliyon* **2022**, *8* (2), e08953. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08953>.
- (135) Sonker, N.; Bajpai, J.; Bajpai, A. K.; Mishra, A. Facile Synthesis and Characterization of Iron Oxide–Egg Albumin (IOEA) as Core–Shell Nanoparticles and Study of Water Intake Potential. *Nano-Structures & Nano-Objects* **2018**, *14*, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2018.01.003>.
- (136) Zhao, H.; He, W.; Wang, Y.; Yue, Y.; Gao, X.; Li, Z.; Yan, S.; Zhou, W.; Zhang, X. Biomineralizing Synthesis of Mesoporous Hydroxyapatite–Calcium Pyrophosphate Polycrystal Using Ovalbumin as Biosurfactant. *Mater Chem Phys* **2008**, *111* (2–3), 265–270.
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.04.002>.
- (137) Zhao, Y.; Chen, Z.; Li, J.; Xu, M.; Shao, Y.; Tu, Y. Formation Mechanism of Ovalbumin Gel Induced by Alkali. *Food Hydrocoll* **2016**, *61*, 390–398.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.041>.
- (138) Sonker, N.; Bajpai, J.; Bajpai, A. K.; Mishra, A. Facile Synthesis and Characterization of Iron Oxide–Egg Albumin (IOEA) as Core–Shell Nanoparticles and Study of Water Intake Potential. *Nano-Structures & Nano-Objects* **2018**, *14*, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2018.01.003>.
- (139) Li, M.; Zhu, N.; Zhu, W.; Zhang, S.; Li, F.; Wu, P.; Li, X. Enhanced Emission and Higher Stability Ovalbumin-Stabilized Gold Nanoclusters (OVA-AuNCs) Modified by Polyethyleneimine for the Fluorescence Detection of Tetracyclines. *Microchemical Journal* **2021**, *169*, 106560.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106560>.
- (140) Moshafi, M. H.; Ranjbar, M.; Ilbeigi, G. <p>Biotemplate of Egg White Albumen for Synthesized Iron Oxide Quantum Dots Nanoparticles (QDNPs) and Investigation of Antibacterial Effect against Pathogenic Microbial Strains</P>. *Int J Nanomedicine* **2019**, *Volume 14*, 3273–3282.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S202462>.
- (141) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.

- (142) Suryawanshi, V. D.; Walekar, L. S.; Gore, A. H.; Anbhule, P. V.; Kolekar, G. B. Spectroscopic Analysis on the Binding Interaction of Biologically Active Pyrimidine Derivative with Bovine Serum Albumin. *J Pharm Anal* **2016**, *6* (1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.001>.
- (143) Patel, R.; Kumari, M. Interaction between Pyrrolidinium Based Ionic Liquid and Bovine Serum Albumin: A Spectroscopic and Molecular Docking Insight. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **2016**, *5* (2). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000265>.
- (144) Feng, X.; Liao, D.; Sun, L.; Feng, S.; Wu, S.; Lan, P.; Wang, Z.; Lan, X. Exploration of Interaction between Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) and the Inhibitory Peptide from Wakame (*Undaria Pinnatifida*). *Int J Biol Macromol* **2022**, *204*, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.114>.
- (145) Sun, T.; Liu, L.; Sun, Y.; Tan, C.; Yao, F.; Liang, X.; Wang, Y.; Yang, Y.; Hu, X.; Fan, J. Synthesis and Characterization of TiO₂ Nanoparticles: Applications in Research on the Interaction of Colloidal TiO₂ with Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Sciences* **2012**, *28* (5), 491–496. <https://doi.org/10.2116/analsci.28.491>.
- (146) Santos, W. G. Estudo de Transferência de Energia Eletrônica Entre Poli(p-Fenilenovinileno) e Corantes Iônicos Em Solução. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- (147) Callis, P. R. Binding Phenomena and Fluorescence Quenching. II: Photophysics of Aromatic Residues and Dependence of Fluorescence Spectra on Protein Conformation. *J Mol Struct* **2014**, *1077*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.04.051>.
- (148) Roy, S.; Das, T. K. Spectroscopic Studies of Interaction Between Biologically Synthesized Silver Nanoparticles and Bovine Serum Albumin. *J Nanosci Nanotechnol* **2014**, *14* (7), 4899–4905. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9508>.
- (149) Soares, F. A. Síntese e Estudo Da Interação de Novos Ésteres Benzotiazepínicos Com a Proteína BSA via Espectroscopia de Fluorescência. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- (150) Ravikumar, S.; Sreekanth, T. V. M.; Eom, I.-Y. Interaction Studies of Greenly Synthesized Gold Nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA) Using Fluorescence Spectroscopy. *J Nanosci Nanotechnol* **2015**, *15* (12), 9617–9623. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10908>.
- (151) Mohd Salleh, N. K.; Aziz, F.; Mohtar, S. S.; Mohammad, A. M.; Mhamad, S. A.; Yusof, N.; Jaafar, J.; Wan Salleh, W. N. Strategies to Improve the Antimicrobial Properties of Metal-Oxide Based Photocatalytic Coating: A Review. *Prog Org Coat* **2024**, *187*, 108183. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2023.108183>.
- (152) Zayed, M. F.; Mahfoze, R. A.; El-kousy, S. M.; Al-Ashkar, E. A. In-Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Metal Nanoparticles Biosynthesized Using Optimized Pimpinella Anisum Extract. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2020**, *585*, 124167. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124167>.
- (153) Khurana, C.; Sharma, P.; Pandey, O. P.; Chudasama, B. Synergistic Effect of Metal Nanoparticles on the Antimicrobial Activities of Antibiotics against Biorecycling Microbes. *J Mater Sci Technol* **2016**, *32* (6), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2016.02.004>.

- (154) Nejabatdoust, A.; Zamani, H.; Salehzadeh, A. Functionalization of ZnO Nanoparticles by Glutamic Acid and Conjugation with Thiosemicarbazide Alters Expression of Efflux Pump Genes in Multiple Drug-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains. *Microbial Drug Resistance* **2019**, *25* (7), 966–974. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0304>.
- (155) Ingle, P. U.; Biswas, J. K.; Mondal, M.; Rai, M. K.; Senthil Kumar, P.; Gade, A. K. Assessment of in Vitro Antimicrobial Efficacy of Biologically Synthesized Metal Nanoparticles against Pathogenic Bacteria. *Chemosphere* **2022**, *291*, 132676. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132676>.
- (156) Carvalho, A.; Fernandes, A. R.; Baptista, P. V. Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*; Elsevier, 2019; pp 257–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00010-7>.

APÊNDICE A - Espectros de fluorescência

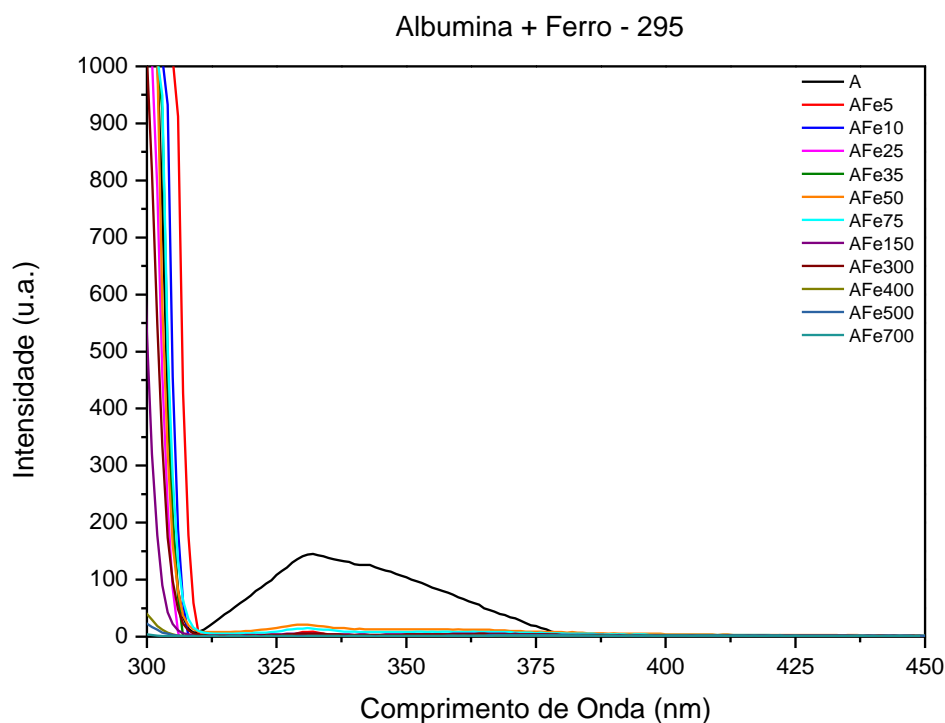


Figura 1A.. Espectro de fluorescência para os ensaios de albumina com ferro sem ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

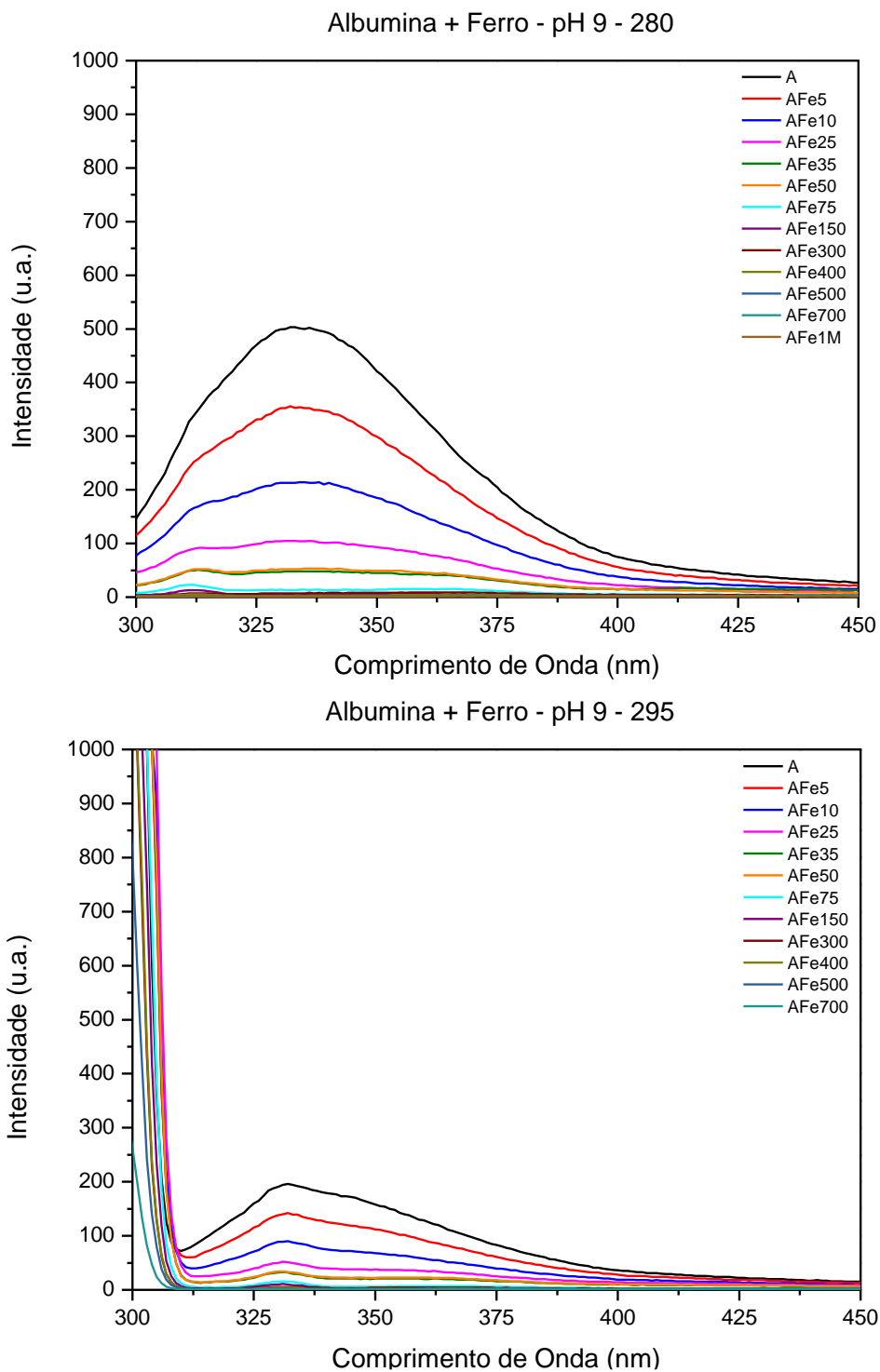


Figura 2A. Espectro de fluorescência para os ensaios de albumina com ferro com ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

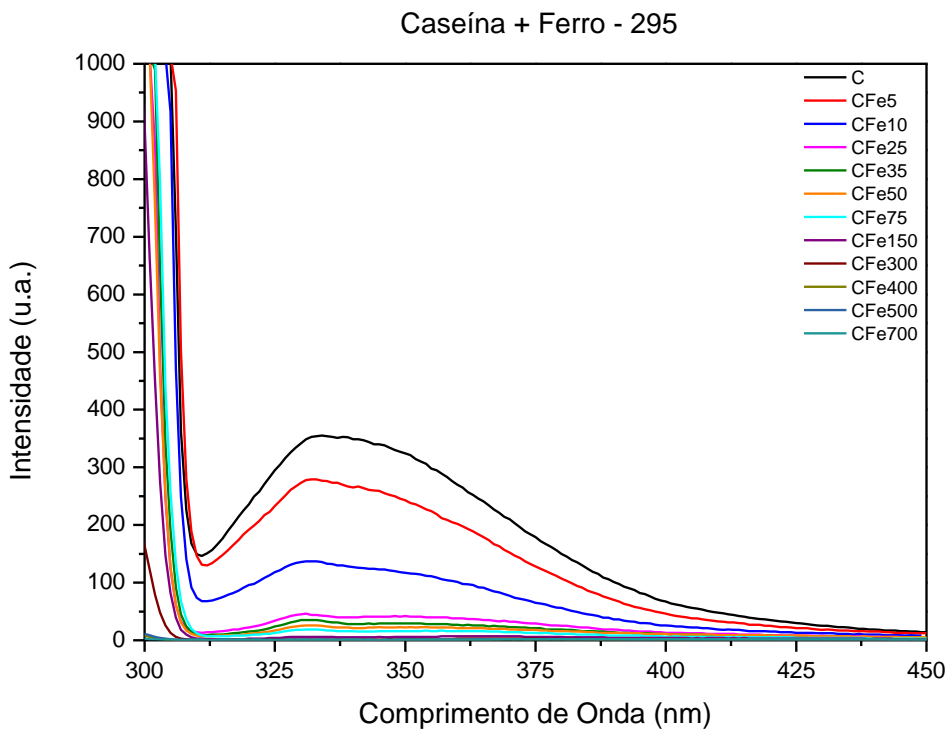
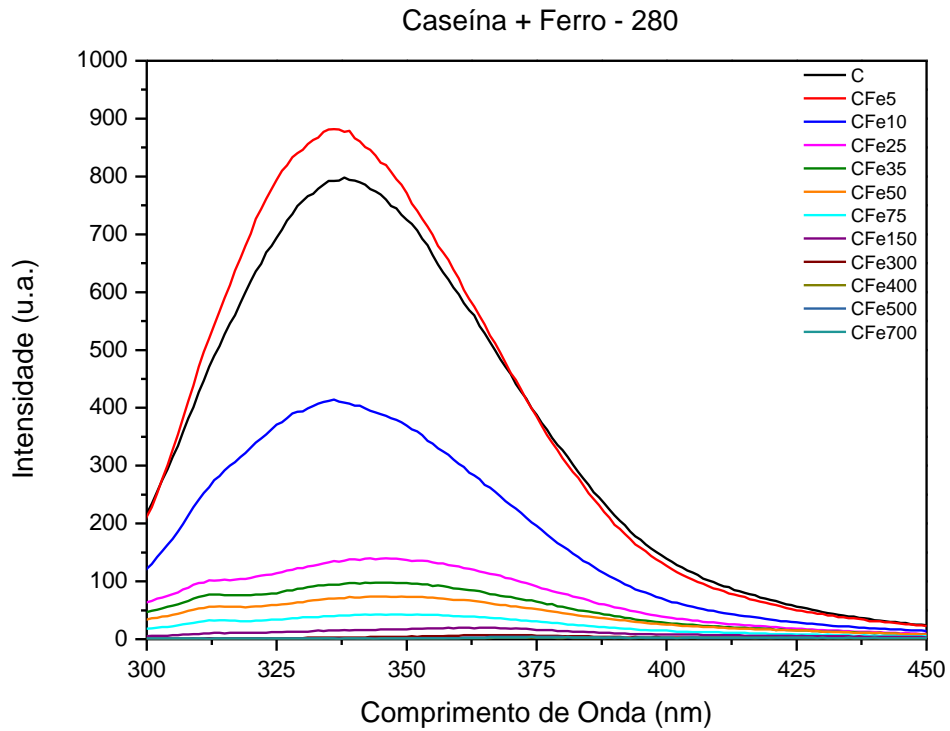


Figura 3A. Espectro de fluorescência para os ensaios de caseína com ferro sem ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

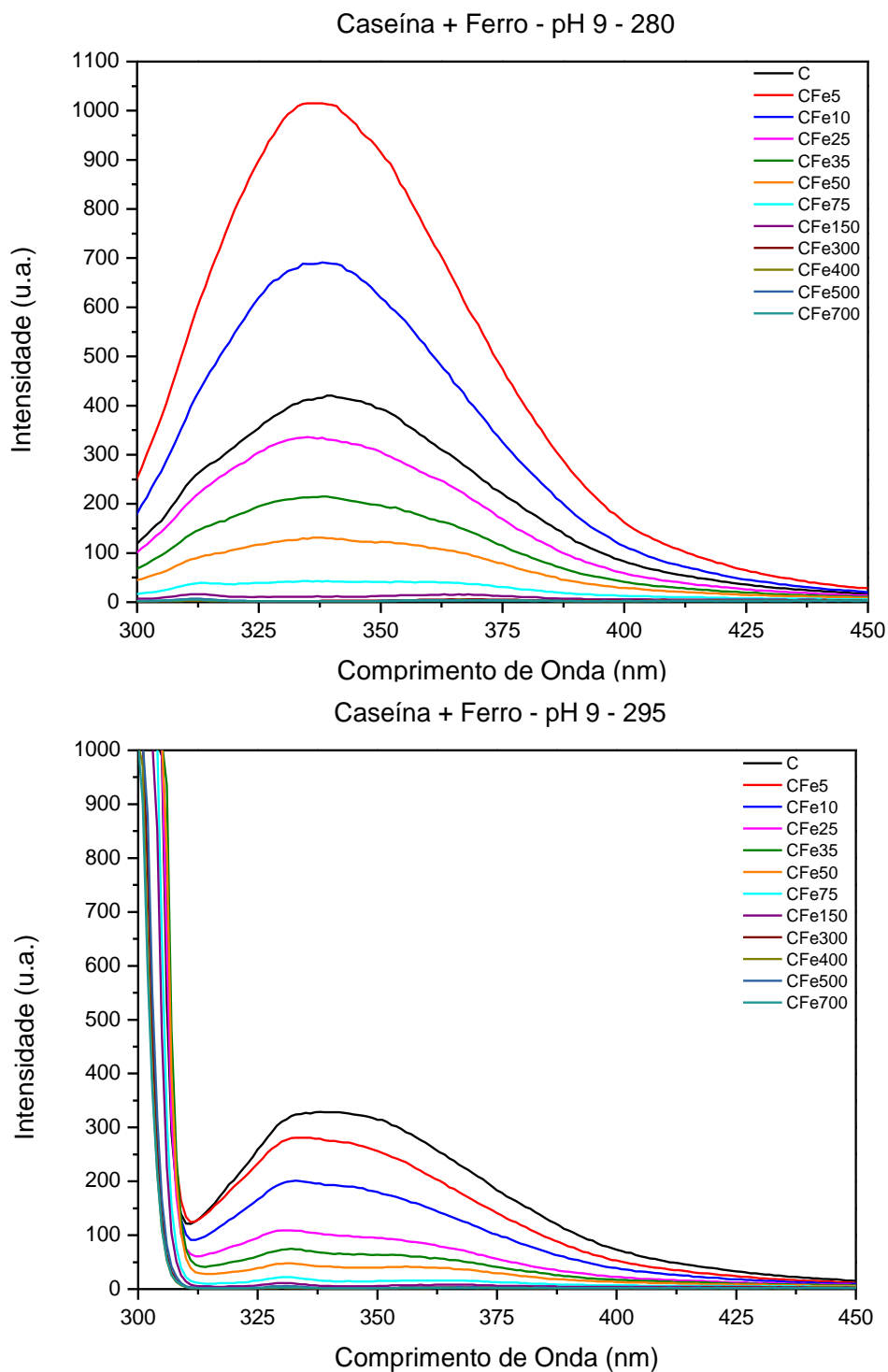


Figura 4A. Espectro de fluorescência para os ensaios de caseína com ferro com ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

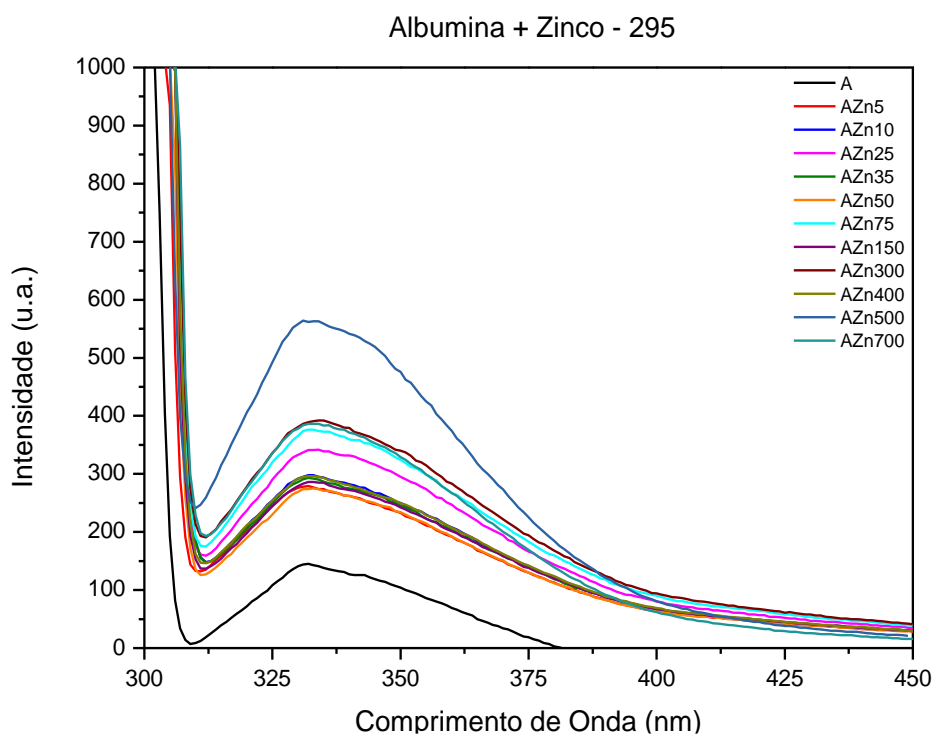
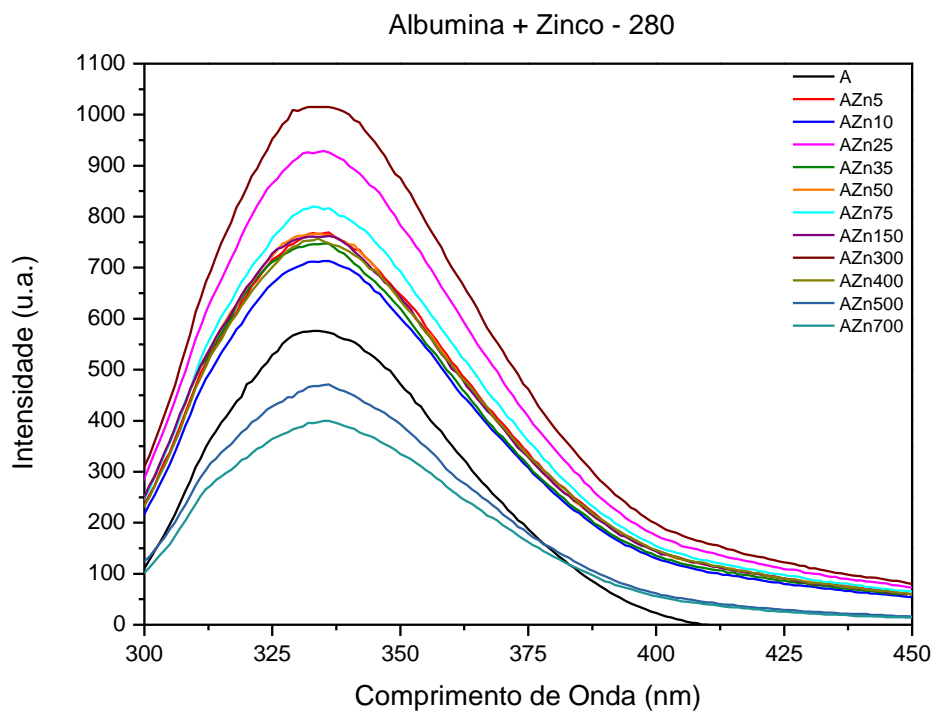


Figura 5A. Espectro de fluorescência para os ensaios de albumina com zinco sem ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

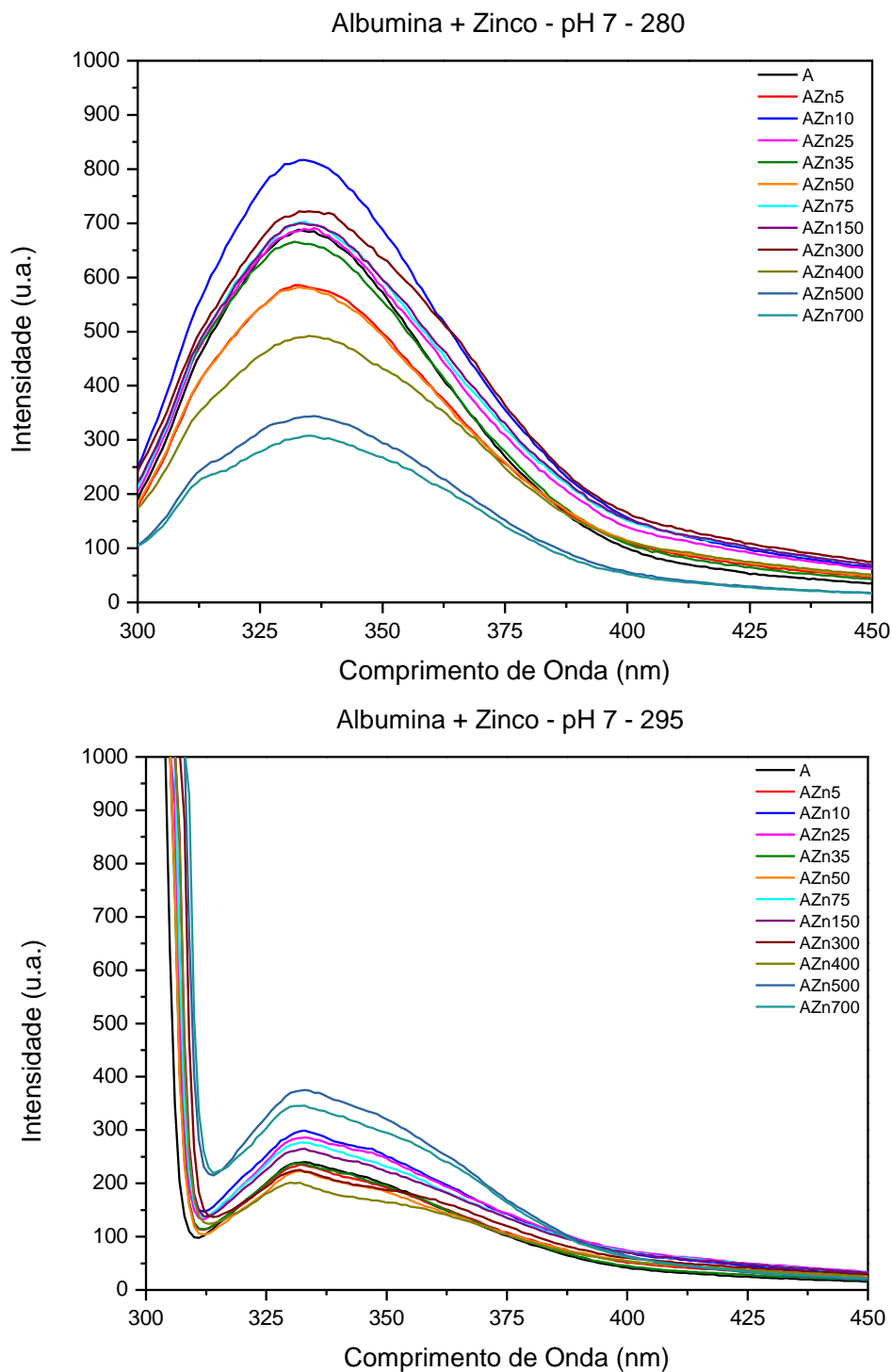


Figura 6A. Espectro de fluorescência para os ensaios de albumina com zinco sem ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

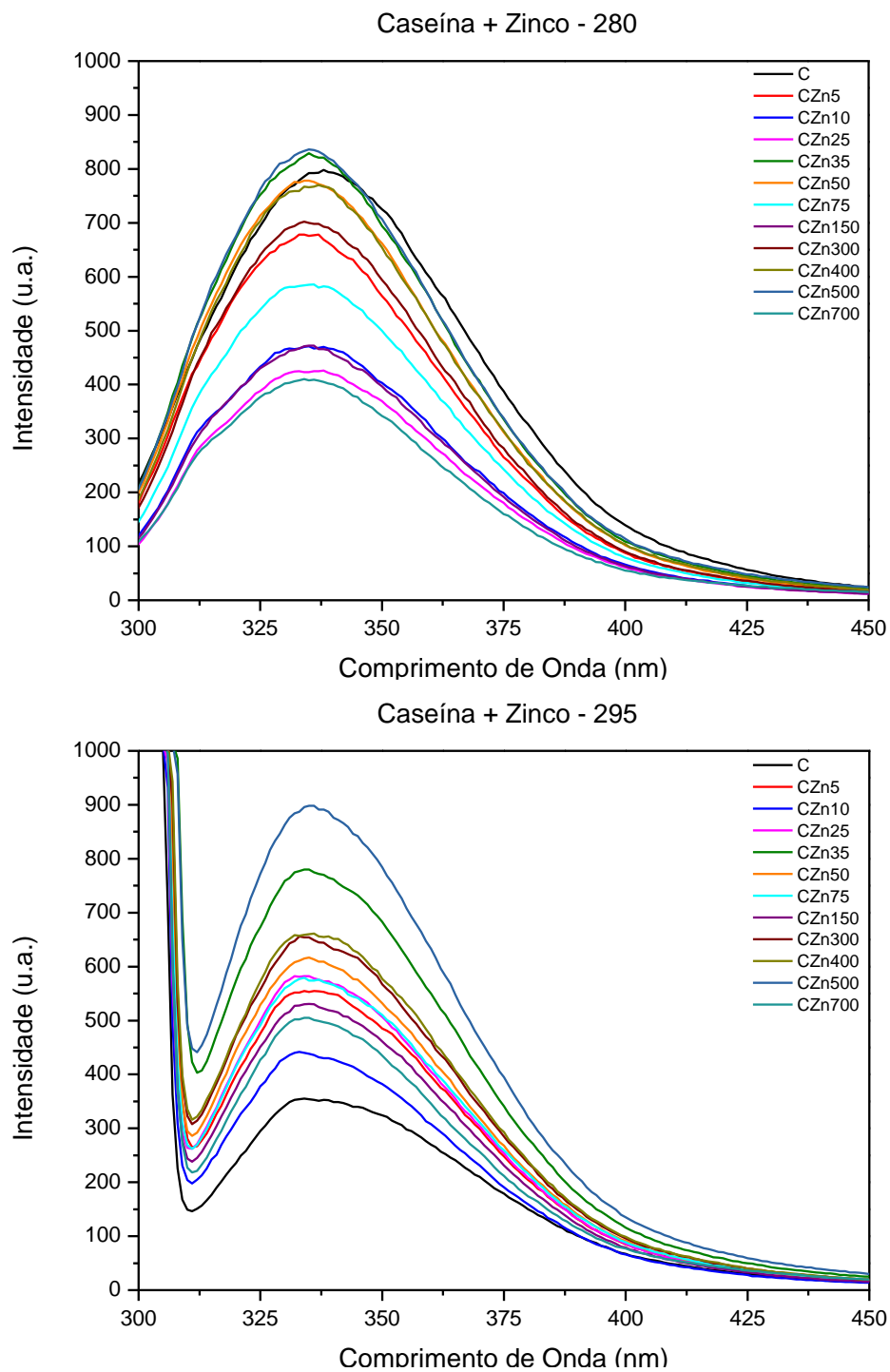


Figura 7A. Espectro de fluorescência para os ensaios de caseína com zinco sem ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

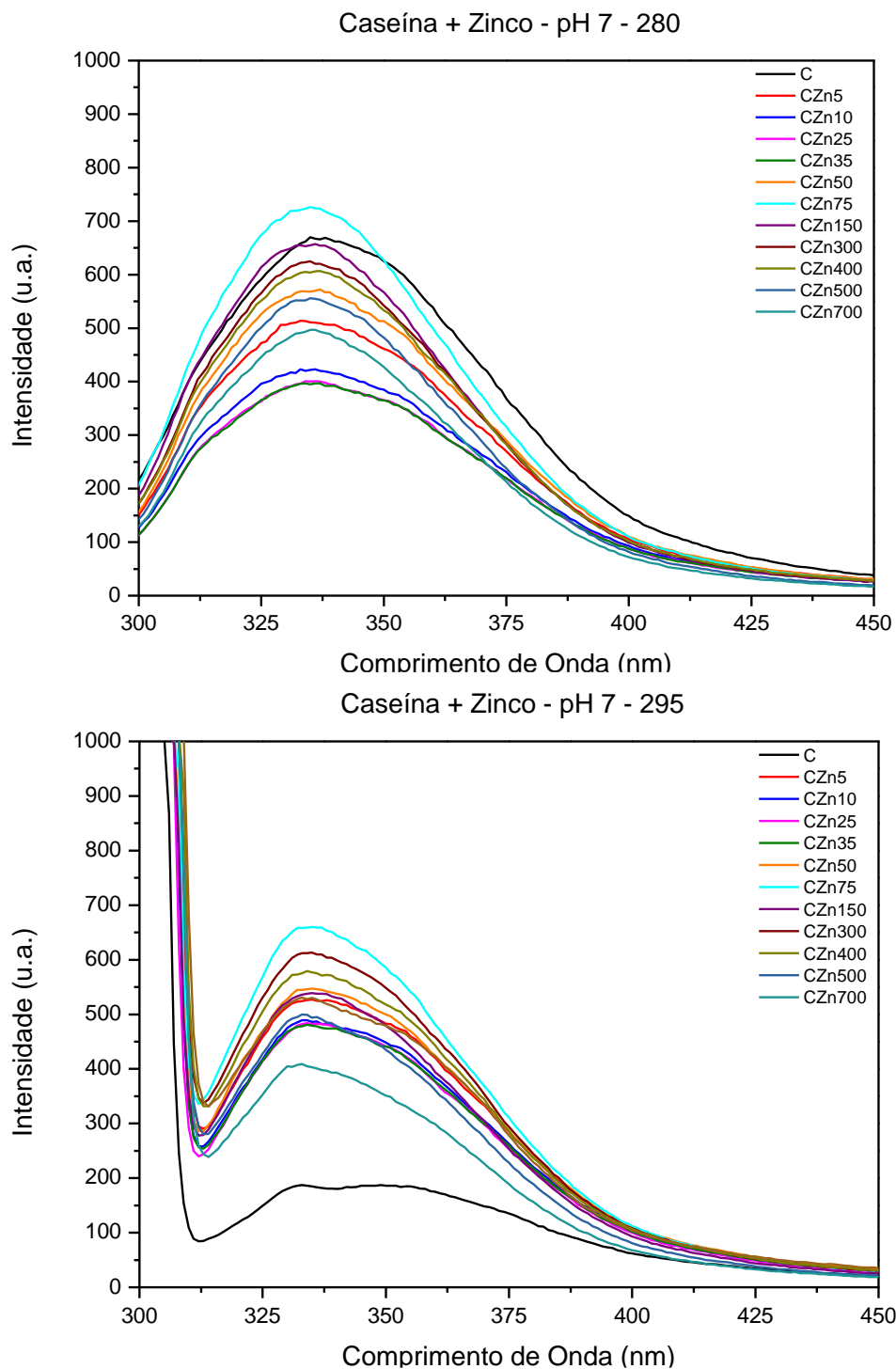


Figura 8A. Espectro de fluorescência para os ensaios de caseína com zinco com ajuste de pH em comprimentos de onda excitação de 280 (A) e 295nm (B).

APÊNDICE B - Dados de intensidade de fluorescência

Tabela 1B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de zinco, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	Diluição	Fluorescência Corrigida
AZn0 - 280	573,4	250	143350
AZn5- 280	768,14	500	384070
AZn10 - 280	715,36	500	357680
AZn25 - 280	926,23	500	463115
AZn35 - 280	746,27	500	373135
AZn50 - 280	765,61	500	382805
AZn75 - 280	820,39	500	410195
AZn150 - 280	761,13	500	380565
AZn300 - 280	1014,41	500	507205
AZn400 - 280	753,81	500	376905
AZn500 - 280	470,32	250	117580
AZn700 - 280	402,4	250	100600

Tabela 2B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de zinco, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AZn0 - 295	148,27	250	37067,5
AZn5 - 295	277,78	250	69445
AZn10 - 295	298,23	250	74557,5
AZn25 - 295	339,96	250	84990
AZn35 - 295	292,84	250	73210
AZn50 - 295	275,02	250	68755
AZn75 - 295	376,15	250	94037,5
AZn150 - 295	286,13	250	71532,5
AZn300 - 295	390,94	250	97735
AZn400 - 295	296,33	250	74082,5

AZn500 - 295	562,19	250	140547,5
AZn700 - 295	385,13	250	96282,5

Tabela 3B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de ferro, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AFe0 - 280	573,4	250	143350
AFe5- 280	63,26	250	15815
AFe10 - 280	27,65	250	6912,5
AFe25 - 280	0	250	0
AFe35 - 280	0	250	0
AFe50 - 280	34,95	250	8737,5
AFe75 - 280	20,2	250	5050
AFe150 - 280	7,81	250	1952,5
AFe300 - 280	7,81	250	1952,5
AFe400 - 280	0	250	0
AFe500 - 280	0	250	0
AFe700 - 280	0	250	0

Tabela 4B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de ferro, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AFe0 - 295	148,27	250	37067,5
AFe5 - 295	8,41	250	2102,5
AFe10 - 295	0	250	0
AFe25 - 295	0	250	0
AFe35 - 295	0	250	0
AFe50 - 295	0	250	0
AFe75 - 295	21,39	250	5347,5
AFe150 - 295	5,3	250	1325

AFe300 - 295	5,3	250	1325
AFe400 - 295	0	250	0
AFe500 - 295	0	250	0
AFe700 - 295	0	250	0

Tabela 5B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de zinco, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CZn0 - 280	797,53	500	398765
CZn5- 280	679,02	500	339510
CZn10 - 280	468,97	500	234485
CZn25 - 280	422,3	500	211150
CZn35 - 280	828,8	500	414400
CZn50 - 280	777,53	500	388765
CZn75 - 280	582,77	500	291385
CZn150 - 280	470,42	500	235210
CZn300 - 280	701,94	500	350970
CZn400 - 280	763,9	500	381950
CZn500 - 280	836,11	500	418055
CZn700 - 280	409,72	500	204860

Tabela 6B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de zinco, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	Diluição	Fluorescência Corrigida
CZn0 - 295	354,96	250	88740
CZn5 - 295	555,35	250	138837,5
CZn10 - 295	440,99	250	110247,5
CZn25 - 295	582,13	250	145532,5
CZn35 -295	780,13	250	195032,5
CZn50 - 295	613,33	250	153332,5

CZn75 - 295	579,18	250	144795
CZn150 - 295	530,04	250	132510
CZn300 - 295	654,97	250	163742,5
CZn400 - 295	657,92	250	164480
CZn500 - 295	899,33	250	224832,5
CZn700 - 295	504,54	250	126135

Tabela 7B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de ferro, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CFe0 - 280	881,2	250	220300
CFe5- 280	883,04	250	220760
CFe10 - 280	415,26	250	103815
CFe25 - 280	134,38	250	33595
CFe35 - 280	98,23	250	24557,5
CFe50 - 280	74,01	250	18502,5
CFe75 - 280	42,2	250	10550
CFe150 - 280	17,98	250	4495
CFe300 - 280	4,1	250	1025
CFe400 - 280	0,453	250	113,25
CFe500 - 280	0	250	0
CFe700 - 280	0	250	0

Tabela 8B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de ferro, sem ajuste de pH, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CFe0 - 295	354,96	250	88740
CFe5 - 295	277,15	250	69287,5
CFe10 - 295	136,68	250	34170
CFe25 - 295	42,51	250	10627,5
CFe35 - 295	33,7	250	8425

CFe50 - 295	25,76	250	6440
CFe75 - 295	17,5	250	4375
CFe150 - 295	6,08	250	1520
CFe300 - 295	1,08	250	270
CFe400 - 295	0	250	0
CFe500 - 295	0	250	0
CFe700 - 295	0	250	0

Tabela 9B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de zinco, em pH 7, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AZn0 - 280 _ 7	687,61	250	171902,5
AZn5- 280 _ 7	587,13	250	146782,5
AZn10 - 280 _ 7	816,39	250	204097,5
AZn25 - 280 _ 7	689,34	250	172335
AZn35_ 280 _ 7	662,97	250	165742,5
AZn50 - 280 _ 7	581,35	250	145337,5
AZn75 - 280 _ 7	704,55	250	176137,5
AZn150 - 280 _ 7	698,97	250	174742,5
AZn300 - 280 _ 7	721,68	250	180420
AZn400 - 280 _ 7	492,42	250	123105
AZn500 - 280 _ 7	342,4	500	171200
AZn700 - 280 _ 7	308,16	500	154080

Tabela 10B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de zinco, em pH 7, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AZn0 - 295 _ 7	239,73	250	59932,5
AZn5 - 295 _ 7	233,17	250	58292,5
AZn10 - 295 _ 7	299,91	250	74977,5
AZn25 - 295 _ 7	286,8	250	71700

AZn35 - 295 _ 7	237,62	250	59405
AZn50 - 295 _ 7	223,4	250	55850
AZn75 - 295 _ 7	276,59	250	69147,5
AZn150 - 295 _ 7	266,04	250	66510
AZn300 - 295 _ 7	225,51	250	56377,5
AZn400 - 295 _ 7	201,53	250	50382,5
AZn500 - 295 _ 7	374,3	250	93575
AZn700 - 295 _ 7	346,5	250	86625

Tabela 11B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de zinco, em pH 7, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CZn0 - 280 _ 7	671,95	250	167987,5
CZn5 - 280 _ 7	508,41	500	254205
CZn10 - 280 _ 7	423,92	500	211960
CZn25 - 280 _ 7	401,29	500	200645
CZn35 - 280 _ 7	391,84	500	195920
CZn50 - 280 _ 7	570,56	500	285280
CZn75 - 280 _ 7	724,66	500	362330
CZn150 - 280 _ 7	655,06	500	327530
CZn300 - 280 _ 7	624,98	500	312490
CZn400 - 280 _ 7	606,94	500	303470
CZn500 - 280 _ 7	556,28	500	278140
CZn700 - 280 _ 7	497,11	500	248555

Tabela 12B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de zinco, em pH 7, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CZn0 - 295 _ 7	188,26	250	47065
CZn5 - 295 _ 7	528,33	250	132082,5
CZn10 - 295 _ 7	493,06	250	123265

CZn25 - 295 _ 7	479	250	119750
CZn35 - 295 _ 7	479	250	119750
CZn50 - 295 _ 7	547,16	250	136790
CZn75 - 295 _ 7	658,95	250	164737,5
CZn150 - 295 _ 7	537,78	250	134445
CZn300 - 295 _ 7	612,78	250	153195
CZn400 - 295 _ 7	579,38	250	144845
CZn500 - 295 _ 7	500,46	250	125115
CZn700 - 295 _ 7	408,52	250	102130

Tabela 13B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de ferro, em pH 9, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CFe0 - 280 _ 9	415,11	500	207555
CFe5 - 280 _ 9	1015,32	250	253830
CFe10 - 280 _ 9	687,68	250	171920
CFe25 - 280 _ 9	335,46	250	83865
CFe35 - 280 _ 9	215,98	250	53995
CFe50 - 280 _ 9	130,41	250	32602,5
CFe75 - 280 _ 9	38,48	250	9620
CFe150 - 280 _ 9	16,74	250	4185
CFe300 - 280 _ 9	0	250	0
CFe400 - 280 _ 9	0	250	0
CFe500 - 280 _ 9	0	250	0
CFe700 - 280 _ 9	0	250	0

Tabela 14B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de caseína com adição de ferro, em pH 9, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
CFe0 - 295 _ 9	323,47	250	80867,5
CFe5 - 295 _ 9	280,65	250	70162,5

CFe10 - 295 _ 9	199,58	250	49895
CFe25 - 295 _ 9	109,35	250	27337,5
CFe35 - 295 _ 9	75,69	250	18922,5
CFe50 - 295 _ 9	48,43	250	12107,5
CFe75 - 295 _ 9	22,36	250	5590
CFe150 - 295 _ 9	10,8	250	2700
CFe300 - 295 _ 9	0	250	0
CFe400 - 295 _ 9	0	250	0
CFe500 - 295 _ 9	0	250	0
CFe700 - 295 _ 9	0	250	0

Tabela 15B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de ferro, em pH 9, e em comprimento de onda de 280nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AFe0 - 280 _ 9	503,21	250	125802,5
AFe5 - 280 _ 9	356,49	250	89122,5
AFe10 - 280 _ 9	211,96	250	52990
AFe25 - 280 _ 9	106,07	250	26517,5
AFe35 - 280 _ 9	47,98	250	11995
AFe50 - 280 _ 9	52,7	250	13175
AFe75 - 280 _ 9	13,38	250	3345
AFe150 - 280 _ 9	7,07	250	1767,5
AFe300 - 280 _ 9	4,99	250	1247,5
AFe400 - 280 _ 9	0	250	0
AFe500 - 280 _ 9	0	250	0
AFe700 - 280 _ 9	0	250	0

Tabela 16B. Dados referentes a intensidade de fluorescência para as amostras de albumina com adição de ferro, em pH 9, e em comprimento de onda de 295nm.

Amostras	Fluorescência	FD	Fluorescência Corrigida
AFe0 - 295 _ 9	194,57	250	48642,5

AFe5 - 295 _ 9	140,96	250	35240
AFe10 - 295 _ 9	90,09	250	22522,5
AFe25 - 295 _ 9	51,02	250	12755
AFe35 - 295 _ 9	32,86	250	8215
AFe50 - 295 _ 9	33,98	250	8495
AFe75 - 295 _ 9	15,87	250	3967,5
AFe150 - 295 _ 9	10,8	250	2700
AFe300 - 295 _ 9	0	250	0
AFe400 - 295 _ 9	0	250	0
AFe500 - 295 _ 9	0	250	0
AFe700 - 295 _ 9	0	250	0