



## CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS DO SORO DO LEITE E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE IN VITRO E EM CULTURA DE CÉLULAS.

Milena Ferreira **Táccola**<sup>1</sup>; Juliana Espindola dos **Santos**<sup>2</sup>; Fabiana Andrea Barrera **Galland**<sup>3</sup>.

Nº 22202

**RESUMO** – Peptídeos de fonte alimentar, formados a partir da hidrólise, tem mostrado propriedades funcionais benéficas a saúde, como anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial poder antioxidante de peptídeos obtidos a partir de hidrolisados do soro do leite em modelos *in vitro* e em cultura de células. A avaliação antioxidante *in vitro*, através de técnicas como DPPH, ORAC e ABTS, mostraram que o hidrolisado apresenta atividade antioxidante maior do que o isolado proteico do soro do leite. Nos testes em cultura celular (Caco-2), diferentes concentrações do hidrolisado não causaram comprometimento na viabilidade celular, e protegeram as células contra estímulo oxidativo (peróxido de hidrogênio 1 mM), testados por conteúdo de GSH e óxido nítrico. Estes resultados mostram que peptídeos do soro do leite bovino apresentam atividade antioxidante em sistemas *in vitro* e modelos biológicos, podendo ter potencial benéfico a saúde, servindo como alimentos funcionais, e propriedades preventivas para o desenvolvimento de doenças crônicas oxidativas.

**Palavras-chaves:** Bioatividade, Cultura de células, Métodos antioxidantes, Peptídeos, Soro do leite.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Tecnologia em Processos Químicos, FATEC, Campinas-SP; milenaftaccola@gmail.com

2 Bolsista FAPESP: Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, ITAL, Campinas-SP

3 Orientadora no PPG/ITAL, Campinas-SP



**ABSTRACT** – *Food source peptides, formed from hydrolysis, have shown beneficial health functional properties, such as anti-inflammatory and antioxidant. The objective of this work was to evaluate the potential antioxidant power of peptides obtained from whey hydrolysates in in vitro models and in cell culture. The in vitro antioxidant evaluation, using techniques such as DPPH, ORAC and ABTS, showed that the hydrolyzate has higher antioxidant activity than the whey protein isolate. In cell culture tests (Caco-2), different concentrations of the hydrolyzate did not compromise cell viability, and protected cells against oxidative stimulation (1 mM hydrogen peroxide), tested by GSH and nitric oxide content. These results show that bovine whey peptides have antioxidant activity in in vitro systems and biological models, and may have potential health benefits, serving as functional foods, and preventive properties for the development of chronic oxidative diseases.*

**Keywords:** Bioactivity, Cell culture, Antioxidant methods, Peptides, Whey



## 1. INTRODUÇÃO

Os componentes ou substâncias bioativas de fonte alimentar são aquelas que exercem uma função além da nutricional (crescimento e desenvolvimento), desencadeando uma reação fisiológica benéfica na prevenção e manutenção da saúde (DHAVAL; YADAV; PURWAR, 2016). Especificamente, os peptídeos bioativos são fragmentos da sequência de proteína onde são expostos sítios ativos, antes escondidos na estrutura original da proteína, que podem exercer um importante papel na modulação de funções fisiológicas, como anti-inflamatória e antioxidante (HAYES, 2018).

A bioatividade de compostos alimentares pode ser testada de forma química *in vitro*. Essas técnicas têm a vantagem de serem mais simples, de fácil manipulação, com resposta rápida e serem menos custosas. Especificamente em relação a atividade antioxidante, existem diversas técnicas com o propósito de avaliar a capacidade antioxidante de compostos alimentares, entre as principais DPPH e ABTS, as quais são técnicas colorimétricas, que medem a capacidade de proteger a oxidação por um radical. Ainda, a técnica ORAC, é um ensaio fluorimétrico, que mede a capacidade de redução do radical peroxil, que é gerado pela degradação térmica do AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano)di-hidroclorado) e preservação da molécula de fluoresceína pelo antioxidante testado na amostra (CHISTÉ et al., 2011).

Outro método de avaliação da atividade antioxidante é o uso de culturas celulares. Este modelo é uma importante ferramenta para a ciência dos alimentos, podendo fornecer respostas mais biológicas, com menor custo, sem fazer o uso de animais em laboratórios. Estímulos que gerem oxidação nestas células podem ativar vias oxidativas intracelulares e compostos bioativos podem ser usados como potenciais inibidores da oxidação. Diversos ensaios podem ser utilizados, como a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, produção de óxido nítrico e conteúdo do antioxidante endógeno glutathione.

Até então, não existem estudos que testam o poder antioxidante dos hidrolisados do soro do leite em modelos celulares, mas tendo em conta resultados positivos *in vitro*, é importante a avaliação desse material em sistemas biológicos, para saber o potencial desses peptídeos no corpo humano.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Caracterização da amostra**

#### **2.1.1. HIDRÓLISE**

O isolado proteico do soro do leite foi hidrolisado pelo método infogest, que é um protocolo internacionalmente reconhecido de digestão gástrica que simula as etapas de digestão salivar, gástrica e intestinal utilizando enzimas pepsina e pancreatina (BRODKORB et al., 2019).

#### **2.1.2. MÉTODO KJELDAHL – DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A dosagem de proteínas das amostras foi feita através do método micro-Kjeldahl (AOAC INTERNATIONAL, 2012), que se resume a digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado, destilação de amônia e titulação de borato de amônia com HCl padronizado.

#### **2.1.3. Cromatografia de exclusão molecular com colunas em série (FPLC)**

Utilizando o cromatógrafo Fast Protein Liquid Chromatograph (Akta Pure, GE, Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) foi feita a separação e análise do tamanho molecular dos peptídeos do soro de leite, através da exclusão de tamanho (SE-FPLC). As amostras foram diluídas na concentração de 5mg/mL. Padrões foram utilizados para formar uma curva analítica e estabelecer faixas de peso molecular de acordo com o tempo de retenção de aromáticos compostos.

### **2.2. Métodos antioxidantes**

#### **2.2.1. Método DPPH**

Baseado no procedimento descrito por (PIRES et al., 2017), foi preparado uma solução de DPPH 80uM, onde a mesma foi pipetada em uma placa de 96 poços, junto das amostras previamente diluídas. As amostras foram comparadas com a curva padrão de trolox. Os resultados foram realizados em triplicatas e absorbância medida a 517nm.

#### **2.2.2. Método ABTS**

Essa técnica baseia-se no procedimento descrito por (DRYÁKOVÁ et al., 2010; INDRACANTI; CHV; SISAY, 2019), onde inicialmente foi preparada uma solução de ABTS 7mM, que

foi adicionada em uma placa de 96 poços com as diluições seriadas de HSL, ISL e Trolox, totalizando 200 µL por poço. A leitura foi realizada após incubação no escuro por 6 minutos, em um leitor de microplacas com absorvância a 734nm.

### 2.2.3. Método ORAC

Tal método se baseia em (ALVES et al., 2010; CORROCHANO et al., 2019). Ocorreu o preparo de soluções como PBS 75Mm (pH 7,4), Fluoresceína 0,117µM, APPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)) 40mM e a curva padrão de trólox 100mM. As amostras e a curva padrão de trólox foram diluídas seriadamente em solução de PBS, e pipetadas em placa de 96 poços preta, juntamente com a solução de fluoresceína. A mesma foi incubada ao abrigo da luz por 15 minutos, a 37°C, e adicionados 60 µL da solução de APPH, totalizando 200 µL por poço. A leitura de fluorescência foi realizada durante 2h a cada 90 segundos, em um leitor de microplacas.

## 2.3. Cultura celular

### 2.3.1. Cultura de células Caco-2 e tratamento

Para o cultivo celular de Caco-2 (de origem humana e de adenocarcinoma, derivada do epitélio intestinal, que foram obtidas através do Instituto Adolfo Lutz), as mesmas foram cultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> em DMEM 10% com soro fetal bovino a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, ocorrendo reposição do meio em um período de 2 a 3 dias. Após confluências as células são tripsinizadas (0,05% de tripsina/ácido etileno diaminotetracético – EDTA) e semeadas em placas de 24 poços até o tratamento.

O tratamento consistiu na incubação de hidrolisado do soro do leite bovino (HSL) e peróxido durante 3h, na seguinte ordem (em triplicatas): (1) basal; (2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM; (3) HSL 0,01mg/mL; (4) HSL 0,01mg/mL+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM; (5) HSL 0,25mg/mL; (6) HSL 0,25mg/mL+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM; (7) HSL 1mg/mL; (8) HSL 1mg/mL+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM.

### 2.3.2. Avaliação da viabilidade

As células foram incubadas com 5uL de MTT 5mg/mL em 500uL de DMEM sem SFB. Após 30 minutos o meio de cultura é retirado e adicionado 300uL de DMSO e agitado para dissolução dos cristais. Os 24 poços são pipetados em uma placa de 96 poços e é realizada a leitura simultânea da absorvância em 560 e 650nm, em um leitor de microplacas.

### 2.3.3. Produção de óxido nítrico

Em uma placa de 96 poços são pipetados os sobrenadantes da placa de 24 poços e a curva de NaNO<sub>2</sub> (partindo de uma concentração 1mM). Os reagentes Griess A (sulfanilamida 1% em 5% ácido ortofosfórico) e B (N-(1-naftil)etilenodiamina 0,1%) são pipetados nos poços e são encubados por 10 minutos, onde posteriormente é lido em um leitor de microplacas em absorvância de 540nm.

### 2.3.4. Determinação do conteúdo de glutathiona

As amostras foram homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) contendo 5 mM de EDTA e proteína foi precipitado com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante foi testado com o-ftaldialdeído (1 mg/mL metanol) à temperatura ambiente durante 15 min. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi empregada usando soluções GSH padrão (0–500µM). O valor foi ajustado pela quantidade de proteínas medido por Lowry.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. Caracterização físico-química dos hidrolisados do soro do leite

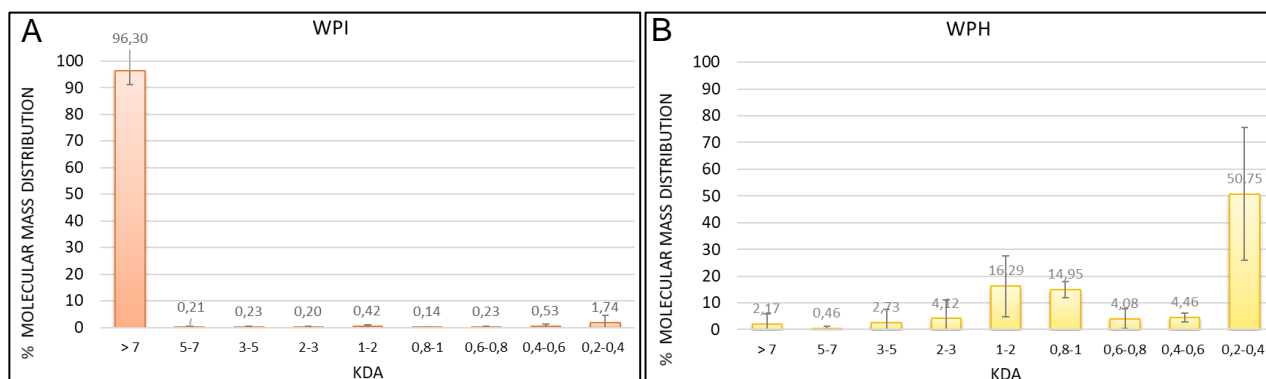
As amostras de Isolado do soro do leite (ISL) foram hidrolisadas pelo método de simulação gástrica INFOGEST (BRODKORB et al., 2019).

Os resultados da caracterização físico-química estão mostrados da Tabela 1. Observa-se que o ISL apresentou em torno de 90% de proteína total, o que está de acordo com as especificações técnicas fornecidas pela empresa de fornecimento. Após procedimento de hidrólise, houve uma perda de proteína, em torno de 25%. Este pode ser explicado pelo processo de hidrólise, o qual acaba quebrando a proteína em peptídeos menores, bem como o processo de centrifugação após procedimento de hidrólise, o qual acaba por retirar os grumos maiores da proteína não digeridos.

**Tabela 1.** Dosagem de proteína nas amostras isoladas e hidrolisadas totais.

| <b><i>Amostra</i></b>             | <b><i>Proteína ± DP (%)</i></b> |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <b><i>ISL</i></b>                 | 89,75±0,01                      |
| <b><i>HSL<sub>total</sub></i></b> | 64,62±0,11                      |

Foi realizado a cromatografia líquida rápida de proteínas para avaliação do peso molecular dos peptídeos obtidos após hidrólise. Os resultados obtidos estão presentes nas figuras 1a e 1b



**Figura 1(a)** Distribuição do peso molecular no Isolado do soro do leite, em KDa; **(b)** Distribuição do peso molecular no hidrolisado do soro do leite total, em KDa;

Na figura 1a, observa-se que no ISL – onde não houve processo de hidrólise – encontram-se peptídeos de maior tamanho molecular. Já o HSL total apresentado na figura 1b, mostra faixa de peso molecular menor, sendo 50% dos peptídeos entre 200 a 400Da, o que é explicado pela efetividade do processo de hidrólise – que quebra as moléculas de proteína.

## 2.2. Métodos antioxidantes in vitro

As análises para avaliação da atividade antioxidante como DPPH, ORAC e ABTS obtiveram os seguintes resultados, apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Atividade antioxidante do HSL (hidrolisado do soro do leite) e do ISL (isolado do soro do leite) nos diferentes ensaios. Os experimentos foram realizados em triplicatas, e as diferenças estatísticas representam ANOVA de uma via, com post-teste de Tuckey. As letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre o HSL e as letras minúsculas representam diferença estatística entre o ISL.

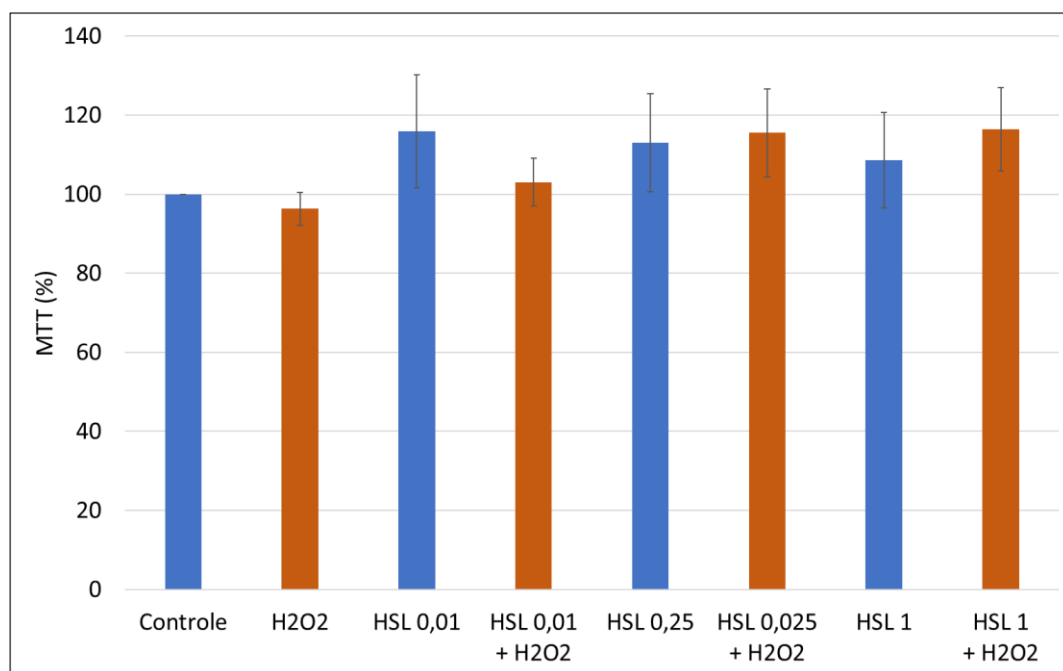
| Concentrações<br>(mg/mL) | ORAC<br>% inibição       |                          | ABTS<br>% inibição       |                           | DPPH<br>% inibição     |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
|                          | ISL                      | HSL                      | ISL                      | HSL                       | ISL                    | HSL                      |
| 1,2                      | 116,7± 38 <sup>c</sup>   | 128,9± 33 <sup>C</sup>   | 54,8 ± 12,0 <sup>b</sup> | 11,8 ± 4,5 <sup>D,C</sup> | 11,0± 3,1 <sup>b</sup> | 5,99 ± 0,4 <sup>B</sup>  |
| 2,5                      | 141,6± 45 <sup>c</sup>   | 125,4± 38 <sup>C</sup>   | 71,6 ± 13,0 <sup>b</sup> | 21,2 ± 4,4 <sup>D</sup>   | 14,2± 4,9 <sup>b</sup> | 12,17 ± 0,5 <sup>B</sup> |
| 5                        | 135,1± 39 <sup>c</sup>   | 132,1± 40 <sup>C</sup>   | 82,6 ± 12,5 <sup>b</sup> | 27,6 ± 7,5 <sup>D,C</sup> | 15,9± 3,1 <sup>b</sup> | 23,31 ± 0,2 <sup>B</sup> |
| 10                       | 134,2± 43 <sup>c</sup>   | 133,2± 42 <sup>C</sup>   | 90,0 ± 9,3 <sup>b</sup>  | 37,9 ± 4,2 <sup>D,C</sup> | 26,5± 7,4 <sup>b</sup> | 42,49 ± 0,3 <sup>B</sup> |
| 20                       | 135,9± 46 <sup>b,c</sup> | 131,5± 41 <sup>B,C</sup> | 94,0 ± 5,3 <sup>b</sup>  | 56,3 ± 7,2 <sup>C,B</sup> | 24,1± 4,8 <sup>a</sup> | 76,92 ± 0,2 <sup>B</sup> |
| 40                       | 132,9± 46 <sup>a,b</sup> | 127,5± 42 <sup>A,B</sup> | 95,9 ± 3,2 <sup>a</sup>  | 60,5 ± 9,4 <sup>B,A</sup> | -                      | 81,74 ± 0,4 <sup>A</sup> |
| 50                       | 124,1± 40 <sup>a</sup>   | 123,7 ± 45 <sup>A</sup>  | 74,9 ± 17,5 <sup>a</sup> | 93,3 ± 2,5 <sup>A</sup>   | -                      | 78,80 ± 0,8 <sup>A</sup> |

Observando os resultados do método ORAC, pode-se concluir que tanto o hidrolisado quanto o isolado mostram alta porcentagem de inibição, sem diferença entre si. Já no método ABTS, o ISL apresentou inibição em baixas concentrações, saturando entre 10 e 50mg/mL e o HSL inibiu dose dependente. No ensaio DPPH, o ISL chegou a inibir cerca de 24% até a concentração 10 a 20mg/mL, e o HSL mostrou maior inibição em maiores concentrações.

### 2.3. Métodos antioxidantes em cultura celular perante tratamento.

Em placas de 24 poços com as células Caco-2 semeadas e já apresentando confluência, é realizado o tratamento com peróxido de hidrogênio e HSL. A amostra HSL foi escolhido para tratamento das cultuas celulares devido ao maior poder antioxidante do que o ISL.

O tratamento consiste em encubar HSL e peróxido de hidrogênio e diferentes concentrações de HSL, durante 3h, em triplicatas. Após o tratamento, o ensaio de viabilidade celular pode ser realizado, onde o resultado é expresso na figura 2.

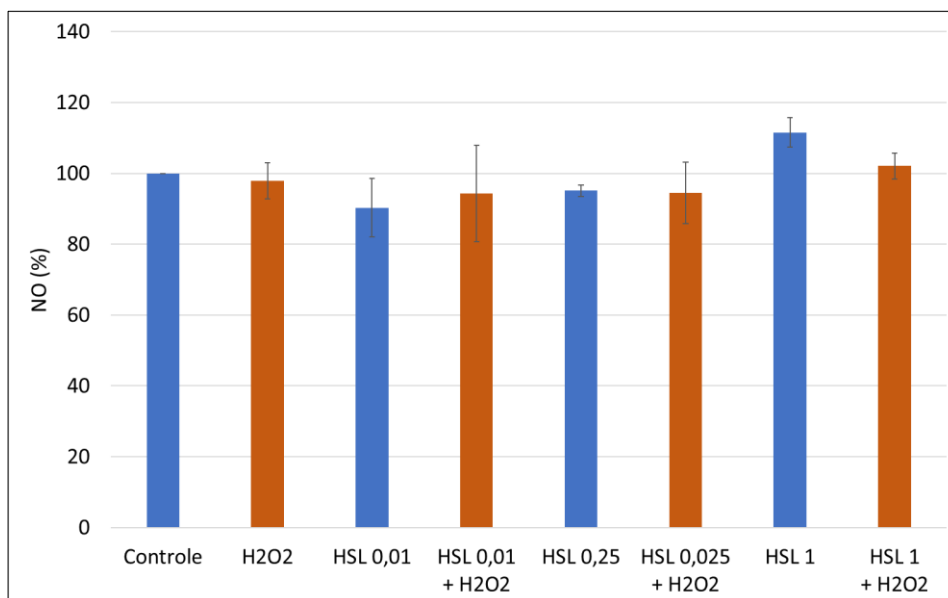


**Figura 2.** viabilidade celular após tratamento de 3h.

Os resultados de MTT mostram que o tratamento com peróxido de hidrogênio ou HSL não compromete a viabilidade da célula, uma vez que não foi observado uma redução de absorbância em nenhum dos tratamentos. O objetivo foi justamente ativar a oxidação, sem promover a morte celular. foi testado se o tratamento promoveria a secreção de óxido nítrico (NO), que indica estresse



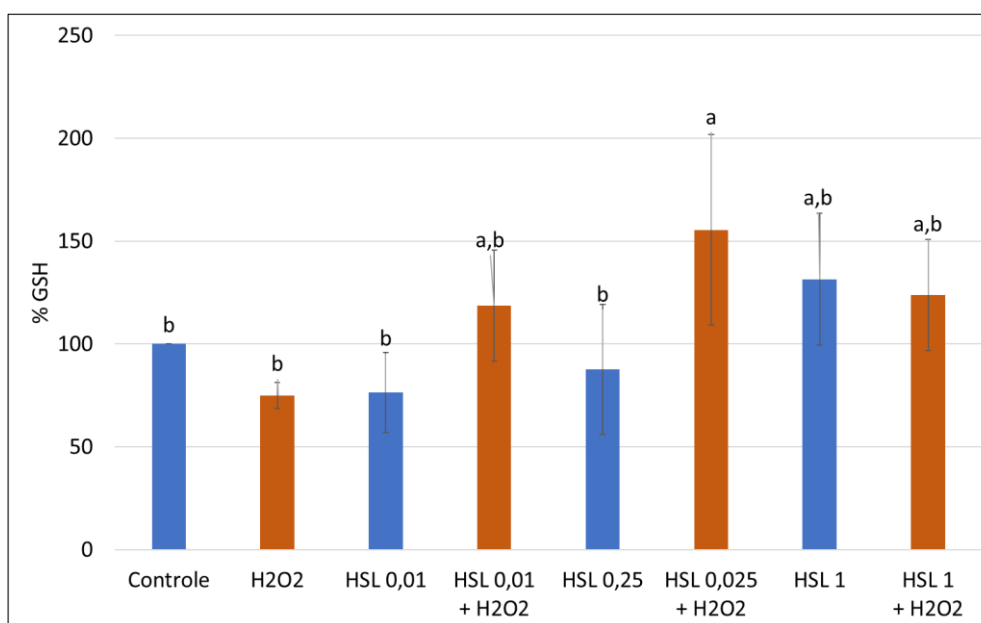
nitrosativo. Esse indicativo pode ser medido no ensaio de avaliação de óxido nítrico no espaço extracelular, apresentado na figura 3.



**Figura 3.** Produção de óxido nítrico após tratamento de 3h.

Observando os resultados, pode-se constatar que não houve diferença significativa da secreção de óxido nítrico entre os diferentes tratamentos, mostrando que o tratamento com peróxido, nem os hidrolisados foram capazes de causar estresse nitrosativo nas células intestinais.

Em relação ao ensaio de conteúdo de glutathiona, os resultados são expressos na figura 4.





**Figura 4.** Conteúdo de glutathione após tratamento de 3h. As letras minúsculas representam diferença estatística entre os tratamentos.

A glutathione é um antioxidante endógeno natural das células, sendo consumida pelos radicais livres quando acontece a oxidação. Os resultados mostram uma tendência a redução do conteúdo de glutathione com o uso do peróxido de hidrogênio, e também uma recuperação da mesma nos tratamentos com hidrolisado do soro de leite bovino. Espera-se aumentar o N amostral para constatar diferença estatística.

### 3. CONCLUSÃO

Apesar de que o hidrolisado do soro do leite tenha apresentado uma alta atividade antioxidante nos ensaios in vitro, as análises em células não são conclusivas. Contudo foi percebida uma tendência do uso do hidrolisado do soro do leite bovino para recuperar o conteúdo de glutathione, um antioxidante natural. É importante destacar que o uso de cultura celular é mais complexo, onde diversas vias intracelulares podem estar ativas e a amostra pode interagir com diferentes vias, assim interferindo nos resultados.

### 4. AGRADECIMENTOS

Sou grata ao CNPq, pela bolsa concedida e pela oportunidade de atuar em um laboratório de pesquisa; Ao ITAL por me proporcionar experiências científicas e a minha equipe que sempre me proporcionou muito aprendizado, conhecimento e auxílio.



## 5. REFERÊNCIAS

- AL-DUAIS, M. et al. **Antioxidant capacity and total phenolics of Cyphostemma digitatum before and after processing: Use of different assays**. European Food Research and Technology, 2009.
- ALVES, C. Q. et al. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Química Nova, 2010.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Capítulo 5: Cultivo Celular**. [s.l: s.n.].
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International - 19th Edition, 2012**. Disponível em: <[https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-19th-edition-2012?product\\_id=1881941](https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoac-international-19th-edition-2012?product_id=1881941)>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- BRODKORB, A. et al. **INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion**. Nature Protocols, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- CHISTÉ, R. C. et al. **In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species**. Food Chemistry, 2011.
- CORROCHANO, A. R. et al. **Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion**. Journal of Dairy Science, 2019.
- DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. **In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – a current review**. Current Opinion in Food Science, 2021.
- DHAVAL, A.; YADAV, N.; PURWAR, S. **Potential Applications of Food Derived Bioactive Peptides in Management of Health**. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2016.
- DRYÁKOVÁ, A. et al. **Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods**. European Food Research and Technology, 2010.
- HAYES, M. **Food proteins and bioactive peptides: New and novel sources, characterisation strategies and applications**. Foods, 2018.
- INDRACANTI, M.; CHV, S.; SISAY, T. **a 96 Well-Microtiter Plate Abts Based Assay for Estimation of Antioxidant Activity in Green Leafy Vegetables**. Biotechnology International, 2019.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant assays for plant and food components**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009.
- PIRES, J. et al. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas**. [s.l: s.n.].
- SOLIMAN, K. F.; MAZZIO, E. A. **In vitro Attenuation of Nitric Oxide Production in C6 Astrocyte Cell Culture by Various Dietary Compounds (44309)**. Experimental Biology and Medicine, v. 218, p. 390–397, 1998.