



Resultado de Pesquisa

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPLEXO PROTEICO-OLEATO DE SÓDIO COM POTENCIAL ANTICÂNCER POR HPLC-DAD E FTIR

**Lucas Emanuel Oliveira Sabino, Universidade Federal
do Norte do Tocantins, emanuel.oliveira@uff.edu.br;**
**Edenilson dos Santos Niculau, Universidade Federal do Norte
do Tocantins, enicolau@uff.edu.br**



I. Apresentação e Justificativa

O leite é um material no qual diversas pesquisas têm-se debruçado para investigar seus efeitos na saúde humana em geral (MARSHALL, 2004; SUN et al., 2012). Em geral, as proteínas do leite são divididas em dois grupos: o grupo de caseínas, que compõe 80% da massa proteica e de whey, que compõe os restantes 20%. O whey protein (ou somente whey) é uma mistura das proteínas beta-lactoglobulina (ausente no leite humano), alfa-lactoalbumina (ALA) e imunoglobulinas.

Ácidos graxos livres, tomam parte em diversos processos fisiológicos do corpo humano (COPPACK; JENSEN; MILES, 1994). De acordo com (COSTANZI; NEUMANN; GERSHENGORN, 2008), os ácidos graxos dão energia – a partir de reações de oxirredução – aos diversos processos do metabolismo e são substâncias essenciais na constituição das células, glândulas e hormônios. Estudos sobre um complexo proteico-lipídico entre a ALA e com ácido oleico mostram atividade anticâncer em uma diversidade de células cancerígenas (HO et al., 2013; PERMYAKOV et al., 2011; RAMMER et al., 2010; RATH et al., 2018, 2014; TOLIN et al., 2010; XIAO et al., 2013). Dito isso, é de interesse estudar estas sínteses a partir do whey protein que é uma mistura de proteínas e investigar se este composto apresenta alguma atividade anticâncer. Além disso, esta pesquisa buscou investigar a mesma atividade com o sal do ácido oleico, o oleato de sódio que já mostrou atividade anticâncer em células cancerígenas (LIŠKOVÁ et al., 2011).

Portanto, esta é uma pesquisa na área de Ciências Exatas e da Terra, com ênfase na bioquímica que busca estudar a potencial sinergia entre a ALA e oleato de sódio e buscar caracterizá-los a partir do uso de técnicas conhecidas na área. A área no qual essa pesquisa se debruça que é a investigação sobre novas metodologias de tratamento de câncer que sejam menos invasivas e que pode resultar na consolidação deste composto em um medicamento a ser usado em larga escala, pois é premente o uso de técnicas que proporcionem melhor qualidade de vida às pessoas acometidas por essa doença, cujo número cresce cada vez mais (BRAY et al., 2018).



Além disso, as técnicas aprendidas no decorrer desta pesquisa ajudam a formar um pesquisador responsável e qualificado que poderá posteriormente dirigir uma pesquisa por conta própria e ainda fornece uma base sobre o que é fazer ciência, ao pensar numa comunidade científica que se constrói com cada vez mais rigor.

De acordo com vários estudos citoquímicos, há alguma evidência para a possível atividade anticarcinogênica do leite humano, e dois complexos proteico-lipídicos formados pela alfa-lactolbumina (humana e bovina) e ácido oleico, denominados HAMLET e BAMLET (FISCHER et al., 2004; HÅKANSSON et al., 1995; PUTHIA et al., 2014). Há outros estudos que apontam para a mesma atividade anticarcinogênica para complexos entre alfa-lactoalbumina (ALA) e o sal orgânico do ácido oleico, o oleato de sódio (DELGADO et al., 2015; XIAO et al., 2013). Para as sínteses, adaptou-se as metodologias de Boyer (2000) e de Nadeem, Svanborg e Ho (2019).

II. Objetivos

III.I Objetivo geral:

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

III.II Objetivos específicos:

- Sintetizar complexos a partir do whey protein comercial com oleato de sódio;
- Sintetizar complexos a partir da lactoalbumina;
- Caracterizar quimicamente os complexos formados usando HPLC-DAD e FTIR.

III. Metodologia

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



Síntese do complexo whey comercial-ácido oleico

O complexo de whey protein comercial com ácido oleico (AO) foi sintetizado utilizando 11 μL de ácido oleico (3,5 mM) e 0,49 g de whey protein. Colocou-se em um tubo falcon contendo 10 mL de tampão fosfato-salino (ou PBS com pH = 7,18), o whey protein isolado e o AO. A mistura foi levada ao vórtex por 10 minutos. Por fim, o complexo foi posto em um frasco de penicilina e desidratada utilizando um dessecador de alimentos por 48 horas à temperatura de 60° C e em seguida armazenada em um dessecador à vácuo para minimizar o contato com umidade e oxigênio.

Síntese do complexo whey comercial-oleato de sódio

O complexo de whey protein com oleato de sódio foi sintetizado utilizando 0,0106 g de oleato de sódio (3,5 mM) e 0,49 g (700 μM) de whey protein isolado. Esses reagentes foram adicionados a um tubo falcon contendo 10 mL de PBS (pH = 7,18). A mistura foi levada ao vórtex por 10 minutos. Finalmente, as misturas foram desidratadas utilizando um dessecador de alimentos a uma temperatura de 60° C por cerca de 48 horas e em seguida armazenada em um dessecador à vácuo para minimizar o contato com umidade e oxigênio.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

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

Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

Utilizou-se o cromatógrafo líquido da Shimadzu 20AT, coluna Shim-pack VP-ODS C18 nas dimensões de 150 L x 4,6 e um detector de arranjo de diodos (DAD). A fase móvel constitui-se em dois solventes, sendo o metanol o solvente B (grau de pureza HPLC, $\geq 99,9\%$) e água deionizada MicroQ, (18,7 μS), acidificada com ácido



acético 1%, sendo o solvente A. As primeiras análises foram executadas no modo isocrático, com 95% de B por 30 minutos com 30 μL da solução-trabalho. O detector no modo varredura de 220 a 780 nm, composto por uma lâmpada de tungstênio e de deutério (D2W). A solução-trabalho, cuja concentração foi de 1 mg/mL, era composta de 10 mg do complexo e 5 mL de metanol.

IV. Resultados

Análise por FTIR

O perfil de absorção do whey protein utilizado tem perfil distinto do whey protein obtido do leite bovino. Isto deve-se principalmente ao seu teor de pureza ser maior do que os outros, ou seja, ele possui majoritariamente a ALA em sua composição, sem interferentes de outras substâncias como lipídios e outras proteínas presentes no whey bovino. Os estiramentos entre 1500 e 1600 cm^{-1} , comprovam a presença das α -hélices presentes na ALA em duas bandas bem proeminentes (FANG; DALGLEISH, 1998), que não se expressam nos complexos com este whey. Os complexos do whey comercial possuem também um perfil similar entre si. Isso indica que os resíduos, ou cromóforos dos ácidos graxos estão invisíveis, o que pode indicar um alto grau de complexação da ALA com o ácido graxo e oleato de sódio.

Análise por HPLC-DAD

Os complexos analisados via HPLC-DAD foram o BAMLET desnatado com oleato de sódio e o whey comercial complexado com oleato de sódio. Os cromatogramas obtidos não foram satisfatórios em caracterizar a presença de oleato de sódio. Foram feitos pelos menos cinco injeções de 30 μL do primeiro complexo e que não resultaram em uma caracterização adequada.

V. Considerações Finais

O desenvolvimento deste trabalho levou a síntese e caracterização dos complexos entre whey protein isolado e ácido oleico e oleato de sódio. As referidas sínteses foram realizadas com êxito como demonstradas pelos espectros de infravermelho, cuja técnica mostrou-se mais viável na caracterização dos complexos, em comparação ao emprego do HPLC que não retornou resultados satisfatórios. Comparadas a outras terapias em desenvolvimento, esses complexos oferecem



vantagens únicas que as destacam como uma alternativa promissora para o tratamento e desenvolvimento de linhas de pesquisa para o combate ao câncer. Além disso, esta pesquisa debruçou-se em métodos mais simples e baratos de todas as suas sínteses, o que pode futuramente, ser explorado para a fabricação dos complexos em larga escala.

VI. Referências Bibliográficas

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

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI 10.3322/caac.21492. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COPPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. In vivo regulation of lipolysis in humans. *Journal of Lipid Research*, v. 35, n. 2, p. 177–193, 1 fev. 1994. DOI 10.1016/S0022-2275(20)41207-6. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520412076>. Acesso em: 31 ago. 2023.

COSTANZI, S.; NEUMANN, S.; GERSHENGORN, M. C. Seven Transmembrane-spanning Receptors for Free Fatty Acids as Therapeutic Targets for Diabetes Mellitus:

Pharmacological, Phylogenetic, and Drug Discovery Aspects. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 24, p. 16269–16273, jun. 2008. DOI 10.1074/jbc.R800014200.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820714298>. Acesso em: 13 dez. 2022.

DELGADO, Y.; MORALES-CRUZ, M.; FIGUEROA, C. M.; HERNÁNDEZ-ROMÁN, J.; HERNÁNDEZ, G.; GRIEBENOW, K. The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α -lactalbumin component. *FEBS Open Bio*, v. 5, n. 1, p. 397–404, 2015. DOI 10.1016/j.fob.2015.04.010. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.fob.2015.04.010>. Acesso em: 13 dez. 2022.

FANG, Y.; DALGLEISH, D. G. The conformation of α -lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. *Food Hydrocolloids*, v. 12, n. 2, p. 121–126, 1 abr. 1998. DOI 10.1016/S0268-005X(98)00003-4. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X98000034>. Acesso em: 7 ago. 2023.

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

HÅKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proceedings of the National Academy*



of Sciences of the United States of America, v. 92, n. 17, p. 8064–8068, 15 ago. 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.8064>.

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

LIŠKOVÁ, K.; AUTY, M. A. E.; CHAURIN, V.; MIN, S.; MOK, K. H.; O'BRIEN, N.; KELLY, A. L.; BRODKORB, A. Cytotoxic complexes of sodium oleate with β -lactoglobulin. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 10, p. 1207–1218, out. 2011. DOI 10.1002/ejlt.201100109. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez6.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/ejlt.201100109>. Acesso em: 13 dez. 2022.

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

VII. Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador o Prof. Dr. Ednilson dos Santos Niculau, às pessoas ligadas ao grupo de pesquisa do LABCROM, à UNIFESSPA pelo apoio no FTIR e à UFNT pelo fomento durante os anos de pesquisa.