

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR REDUÇÃO QUÍMICA

Daniel A. Silva¹; José V. P. Barbosa¹; Ricardo L. Leite¹; Camylly D. A. Nascimento¹; José T. M. C. Júnior¹; Igor D. S. Sampaio¹; Andressa M. F. Silva¹; João P. A. M. Silva¹; Tonny C. C. Leite¹; Amanda R. Sena¹.

¹Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Barreiros

Palavras-Chave: Atividade quelante, Caseína, Hidrolisado.

Introdução

Os hidrolisados proteicos são produtos obtidos a partir da hidrólise de proteínas, um processo que quebra as cadeias de aminoácidos em fragmentos menores, chamados peptídeos ou aminoácidos livres. Os hidrolisados proteicos são vantajosos por serem mais facilmente digeridos e absorvidos pelo organismo em comparação com as proteínas intactas. Devido às suas propriedades nutricionais e funcionais, eles são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, suplementos e produtos para recuperação muscular pós-exercício (Pacheco *et al.*, 2022). Além disso, os hidrolisados proteicos podem apresentar diversas atividades benéficas à saúde, como atividade antioxidante (Nascimento *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024).

Devido à sua atividade antioxidante, os hidrolisados e seus peptídeos podem ser usados na síntese de nanopartículas, combinando esses dois componentes promissores para potencializar suas atividades. Nanopartículas são estruturas com dimensão de 1 a 100 nanômetros, caracterizadas por densidade local de estados, confinamento quântico e excitação de plásmos de superfície favoráveis a aplicações diversas (Noah, 2019).

É possível avaliar de diferentes formas a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e suas diferentes formas de atuação, não é possível utilizar apenas um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida de forma precisa e quantitativamente, com isso, se faz necessário utilizar mais de um método de análise para avaliar a atividade antioxidante de uma substância (Alves *et al.*, 2010).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a bioatividade de nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por redução química utilizando hidrolisado proteico de caseína.

Material e Métodos

As atividades foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, *Campus* Barreiros.

Obtenção das nanopartículas de prata por redução química

Essa etapa foi realizada segundo Brito *et al.* (2022) e Viana *et al.* (2021), com algumas modificações. O hidrolisado proteico de caseína foi obtido previamente (Silva *et al.*, 2024). Para a síntese das nanopartículas estabilizadas com o hidrolisado supracitado, foram dissolvidos 5 mg do hidrolisado em 5 ml de tampão fosfato de sódio (0,02 M, pH 7). Posteriormente foi dissolvido 0,0170 g de nitrato de prata (AgNO₃) em 100 ml de água destilada. Após total dissolução, adicionou-se à solução de AgNO₃, lentamente, a solução contendo o hidrolisado. Durante todo o processo, a mistura foi mantida em agitação magnética vigorosa, até a mudança de coloração para uma cor castanha coloidal de nanopartícula (AgNp). Após aproximadamente 180 minutos as nanopartículas foram obtidas. As AgNp obtidas foram liofilizadas e armazenadas em um frasco âmbar. Todo o processo ocorreu na ausência de luz.

Avaliação da atividade antioxidante (ABTS)

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). O cátion radical ABTS•⁺ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS (7mM) com uma solução de persulfato de potássio (140 mM), ambas em água destilada. A solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Então a solução do radical ABTS•⁺ foi diluída em etanol até uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm, em espectrofotômetro. A amostra foi preparada na concentração de (1 mg/mL). Em eppendorfs foram adicionados 50 µL da amostra e 950 µL da solução de ABTS•⁺. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorbância das amostras foram medidas em um espectrofotômetro a 734 nm. A porcentagem da atividade sequestradora (% AA) foi calculada pela equação:

$$\% AA = 100 \times (Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}$$

Onde % AA é a atividade antioxidante, *Abscontrole* é a absorbância do controle negativo, substituindo a amostra por etanol, e *Absamostra* é a absorbância do radical na presença da amostra.

Avaliação da atividade quelante de cobre

A atividade quelante de cobre da amostra foi realizada de acordo com metodologia de Sánchez-Vioque *et al.* (2012), com adaptações. A mistura reacional consistiu em 500 µL de tampão acetato (50 mM a pH 6,0), e 12,5 µL de CuSO₄ a 5 mM e 125 µL das amostras. Transcorridos 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, 12,5 µL de violeta de pirocatecol (VP) a 4 mM foram adicionados aos ensaios. Um controle positivo foi utilizado (EDTA a 0,0045%) ao invés da amostra. No controle negativo a amostra foi substituída por água destilada. Após mais 30 minutos, a absorbância dos ensaios foi mensurada a 632 nm, em espectrofotômetro. A porcentagem de inibição (%) da formação do complexo VP-Cu²⁺ foi calculada seguindo a seguinte equação:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = (Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}} \times 100.$$

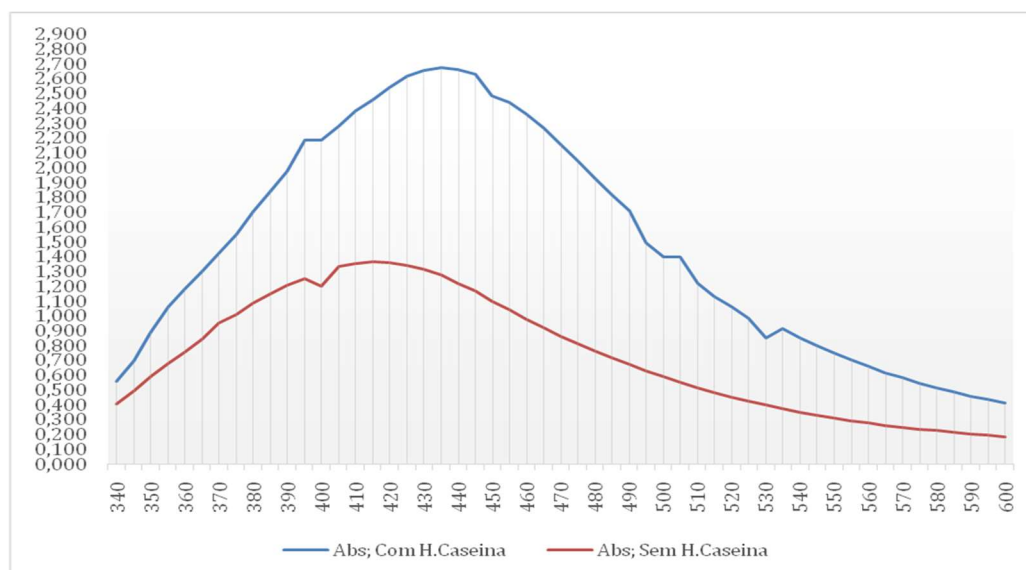
Onde *ABS_{controle}* é a absorbância do controle negativo; e *ABS_{amostra}* é a absorbância dos ensaios contendo a amostra ou EDTA.

Resultados e Discussão

O Gráfico 1, apresenta os resultados obtidos da varredura das nanopartículas de prata por meio de espectroscopia no UV-Vis, o qual se mostrou um método eficaz na detecção das AgNPs.

As AgNPs obtidas apresentaram banda de ressonância plasmônica, com picos entre 410 nm e 440 nm, o qual é caracterizada por partículas com diâmetro médio entre 35 e 80 nm (Kamat *et al.*, 1998; Nair; Pradeep, 2003). Vale ressaltar que quanto menor o comprimento de onda máximo, menor o tamanho das nanopartículas produzidas, e vice-versa (Lemos *et al.*, 2021). A partir do Gráfico 1 pode-se verificar uma diferença nos espectros UV-Visível indicando uma boa estabilidade das AgNPs obtidas ao utilizar o hidrolisado (Lemes *et al.*, 2017).

Gráfico 1: Espectros de absorção das AgNPs com e sem hidrolisado de caseína.



Fonte: o autor (2024).

Em relação à atividade antioxidante e quelante, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre a síntese de nanopartícula com e sem hidrolisado proteico de caseína, em ambas as metodologias.

Tabela 1: Atividade das nanopartículas de prata estabilizadas com hidrolisado da caseína.

Amostras	ABTS AA (%)	AQ Cu^{2+} (%)
AgNPs com H. caseína	$32 \pm 0,2$ a	$84 \pm 0,04$ a
AgNPs sem H. caseína	$23,1 \pm 0,2$ b	$83 \pm 0,1$ b

AA: Atividade antioxidante; AQ: Atividade Quelante; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes entre si pelo teste de Scott-Kontt a 5%. AA: $99,00 \pm 0,1\%$. AQ EDTACU^{2+} : $96 \pm 0,1\%$.

Um estudo realizado por Chandraker *et al.* (2022), avaliou a atividade antioxidante das nanopartículas de prata do extrato aquoso da folha de *Rubia cordifolia* (garança indiana) onde foi encontrado um valor de 85,96 % pelo método de ABTS.

Conclusões

Este é o primeiro estudo onde relata a síntese de nanopartícula de prata com a utilização de hidrolisados proteico de caseína. Os resultados demonstraram que o hidrolisado aumentou o poder antioxidante e quelante ao ser inserido na síntese das mesmas.

Portanto, conclui-se que o composto produzido pode apresentar futuras aplicações na área farmacêutica e/ou alimentícia. No entanto, novas pesquisas utilizando outros métodos, devem ser conduzidas para confirmar o potencial antioxidante.

Agradecimentos

Ao IFPE-Campus Barreiros pela infraestrutura e bolsa concedida.

Referências

- ALVES, R. E. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos de origem vegetal. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- BRITO, J. E. et al. Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas em extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.). **Research, Society and Development**, V. 11, p.1-7, 2022.
- CHANDRAKER, S. K. et al. Potencial terapêutico de nanopartículas de prata biogênicas e otimizadas utilizando extrato da folha de *Rubia cordifolia* L. **Relatórios Científicos**, v. 12, p. 8831, 2022.
- LEMES, G. M.; CASTILHO, M. L.; RANIERO, L. **Influência da concentração de citrato de sódio na formação de nanopartículas prata**. Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, São Paulo, 2017.
http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2017/anais/arquivos/0910_0557_01.pdf
- NASCIMENTO, T. C. E. S. et al. Antarctic fungus proteases generate bioactive peptides from caseinate. **Food Research International**, v. 139, p. 10994.4, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109944.
- NOAH, N. Green synthesis: **Characterization and application of silver and gold nanoparticles**. In: Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles. Elsevier Inc., pp. 111-135, 2019.
- PACHECO, A. F. C. et al. Atividades técnico-funcionais de hidrolisados derivados de proteínas vegetais. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 8, p. 15099-01e, 2022.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- SILVA, D. J. N. et al. Bioactivity of hydrolysates obtained from buffalo caseinate using macambira (*Bromelia laciniosa* L.) proteases. **Concilium**, v. 24, 420-439, 2024.
- VIANA, A. V. et al. Potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata estabilizadas em curcumina e extrato de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). **Research, Society and Development**, v. 10, p. e47610918364-e47610918364, 2021.